



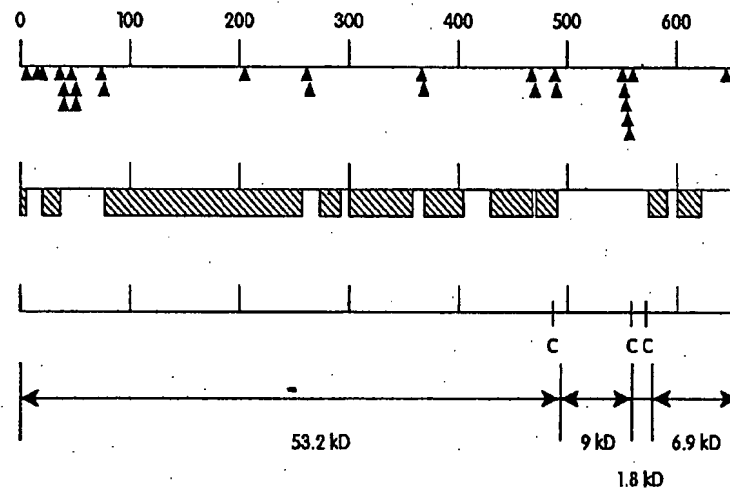
PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

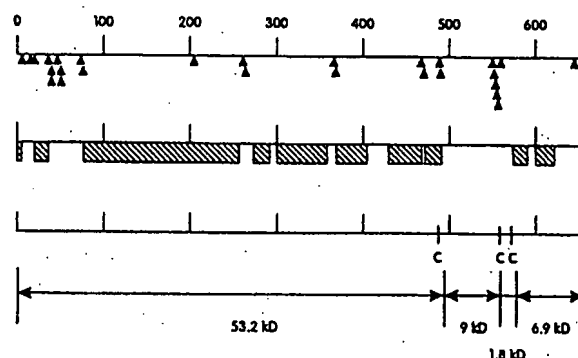
<p>(51) International Patent Classification 5 : C12N 15/12, 15/11, C12Q 1/68 C07K 13/00, A61K 31/70, 37/02 A61K 39/395, G01N 33/577</p>	<p>A1</p>	<p>(11) International Publication Number: WO 94/00573</p> <p>(43) International Publication Date: 6 January 1994 (06.01.94)</p>
<p>(21) International Application Number: PCT/US93/06160</p> <p>(22) International Filing Date: 21 June 1993 (21.06.93)</p> <p>(30) Priority data: 901,701 22 June 1992 (22.06.92) US</p> <p>(71) Applicant: MATRITTECH, INC. [US/US]; 763 D. Concord Avenue, Cambridge, MA 02138 (US).</p> <p>(72) Inventors: TOUKATLY, Gary ; 83-B Christian Hill Road, Amhurst, NH 03031 (US). LIDGARD, Graham, P. ; 77 Kingsbury Street, Wellesley, MA 02141 (US).</p> <p>(74) Agent: KELLEY, Robin, D.; Testa, Hurwitz & Thibault, Exchange Place, 53 State Street, Boston, MA 02109 (US).</p>	<p>(81) Designated States: AU, CA, JP, European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Published With international search report.</p>	

(54) Title: NOVEL MALIGNANT CELL TYPE MARKERS OF THE INTERIOR NUCLEAR MATRIX



(57) Abstract

Disclosed are genetic sequences and their encoded amino acid sequences for two interior nuclear matrix proteins useful as markers of malignant cell types. Primary and secondary structure analysis of the proteins is presented as well as means for their recombinant production, and compositions and methods for the use of these markers in clinical assays and cancer therapies.



請求の範囲

1. 配列番号1の、その変種を含むDNA配列を含む分離核酸。

2. 厳格なハイブリダイゼーション条件下で配列番号1のDNA配列とハイブリダイズする分離核酸。

3. 請求の範囲第1項または第2項の核酸をトランスフェクトした宿主細胞。

4. 請求の範囲第1項または第2項の核酸を含むベクター。

5. 配列番号1の、その変種を含むDNA配列によってコードされ、アジュバントと組み合わされた蛋白または蛋白フラグメント。

6. その変種を含む配列番号1の配列を有する組換え体DNAによって宿主細胞で生成され、当該宿主細胞から分離された蛋白。

7. 請求の範囲第6項の蛋白上のエピトープと結合する結合蛋白。

8. 当該結合蛋白が抗体または抗体フラグメントである、請求の範囲第7項の結合蛋白。

9. a) その変種を含む配列番号1または3のDNAによってコードされる、組換え体によって製造した蛋白または蛋白フラグメントをアジュバントと組み合わせて、哺乳類の注射に適した組成物を形成し；

b) 該組成物を哺乳類に注射し、組換え体により製造した当該蛋白または蛋白フラグメントに対して当該哺乳類に抗体産生を誘発し；

量する付加的工程を含む請求の範囲第11項の方法。

18. 当該サンプルが体液を含む請求の範囲第11項の方法。

19. 当該体液が、血清、血漿、血液、尿、精液、腔分泌物、髄液、腹水、腹腔液、痰、および乳房分泌物から成る群から選ばれる請求の範囲第18項の方法。

20. (a) 配列番号1もしくは3またはその変種のDNAによってコードされるアミノ酸配列を含むマーカー蛋白上のエピトープを細胞死として認識する結合蛋白とサンプルを接触させ；さらに、

(b) 当該組織の細胞から遊離される、配列番号1もしくは3またはその変種のDNA配列によってコードされるアミノ酸配列を含む当該マーカー蛋白またはそのフラグメントの濃度を検出するという、(a)および(b)の工程を含む組織の細胞死の程度を決定する方法であって、検出される当該マーカー蛋白または蛋白フラグメントの濃度が当該組織の細胞死の程度の指標となる細胞死の程度を決定する方法。

21. c) 間隔を置いて当該マーカー蛋白またはその蛋白フラグメントの濃度を検出する工程を繰り返す；さらに、

d) 当該検出濃度を比較するという付加的工程を含む請求の範囲第20項の方法であって、ここで、当該検出濃度における変化が当該組織の状態の指標となる請求の範囲第20項の方法。

22. 当該検出濃度の減少が細胞死の減少の指標となり、当該検出濃度の増加が細胞死の増加の指標となる、病状の変化または治療効果をモニターするために使用する請求の範囲第20項の方法。

23. 当該組織が乳房、前立腺、肺、結腸、卵巣、膀胱また

c) 当該哺乳類から当該抗体を分離するという、a)-c)の工程を含む、異常な細胞型の検出に使用する抗体の製造方法。

10. 当該抗体を当該哺乳類から分離する当該工程が、当該抗体を産生する細胞を当該哺乳類から分離することによって実施される請求の範囲第9項の方法。

11. (a) 配列番号1もしくは3またはその変種のDNAによってコードされるアミノ酸配列を含むマーカー蛋白上のエピトープを認識する結合蛋白とサンプルを接触させ；

(b) 当該マーカー蛋白またはそのフラグメントのサンプル中の存在を検出するという、(a)および(b)の工程を含む、細胞または細胞体残屑を含むサンプルにおいて異常細胞型を検出する方法。

12. 当該異常細胞型が悪性細胞型である請求の範囲第9項または11項の方法。

13. 当該悪性細胞型が膀胱、乳房、前立腺、肺、結腸、卵巣または子宮頸部の悪性細胞型の特徴を有する請求の範囲第12項の方法。

14. 当該結合蛋白が、当該マーカー蛋白または蛋白フラグメント上のエピトープに特異的に結合する抗体である請求の範囲第11項の方法。

15. 当該抗体が、当該エピトープに対して $10^{-6}M^{-1}$ より大きい結合親和性を有する請求の範囲第14項の方法。

16. 当該抗体が、 $10^{-6}M^{-1}$ より大きい結合親和性を有する請求の範囲第15項の方法。

17. 当該サンプルにおいて当該マーカー蛋白の豊富さを定

は子宮頸部組織の特徴を示す請求の範囲第20項の方法。

24. a) 配列番号1または3のDNA配列によってコードされるmRNA転写物であって、翻訳されたときには配列番号1もしくは3またはその変種のアミノ酸配列をコードする当該転写物と特異的にハイブリダイズする核酸とサンプルを接触させ；さらに、

b) 該サンプルにおいて当該mRNA転写物もしくはフラグメントまたはその変種の存在を検出するという、a)およびb)の工程を含む細胞または細胞体残屑を含むサンプルにおける異常細胞型の検出方法。

25. 当該異常細胞型が悪性細胞型である請求の範囲第24項の方法。

26. 当該悪性細胞型が、乳房、前立腺、肺、結腸、子宮頸部または膀胱の悪性細胞型の特徴を示す請求の範囲第25項の方法。

27. 当該核酸が、当該mRNA転写物と厳格なハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする請求の範囲第24項の方法。

28. 当該サンプル中の当該転写物の豊富さを定量する付加的工程を含む請求の範囲第24項の方法。

29. その変種を含むMT1またはMT2のmRNA転写物もしくは蛋白生成物と結合することができる分子の、癌治療剤製造のための使用。

30. 当該癌治療剤が、乳癌、前立腺癌、子宮頸部癌、卵巣癌、膀胱癌、結腸癌または肺癌用である請求の範囲第29項の使用。

31. 当該分子が、配列番号1または3のDNA配列の少なくとも一部分と相補的なオリゴヌクレオチドである請求の範囲第30項の使用。

32. 当該オリゴヌクレオチドが、合成オリゴヌクレオチドで、配列番号5または6の配列の少なくとも一部分を含む請求の範囲第31項の使用。

33. 当該分子が、MT1もしくはMT2またはその変種と実質的に不可逆的に結合することができる結合対の構成物である請求の範囲第29項の使用。

34. 当該結合対の当該構成物が、MT1もしくはMT2またはその変種と約 10^{-6} Mより大きい親和性で結合する請求の範囲第33項の使用。

35. 治療薬の製造に使用する医薬担体と混合された合成オリゴヌクレオチドであって、当該合成オリゴヌクレオチドが、MT1もしくはMT2またはその変種のmRNA転写物の少なくとも一部分と相補的な配列を含んでいる、当該医薬担体と混合された合成オリゴヌクレオチド。

36. 配列番号1もしくは3またはその変種のDNA配列の少なくとも一部分と相補的な配列を含む、請求の範囲第35項の合成オリゴヌクレオチド。

37. 配列番号5もしくは6またはその変種の配列の少なくとも一部分を含む、請求の範囲第35項の合成オリゴヌクレオチド。

38. 長さが少なくとも15ヌクレオチドである、請求の範囲第35項の合成オリゴヌクレオチド。

39. 医薬の製造に使用する結合蛋白であって、当該結合蛋白が、配列番号1もしくは3またはその変種のDNAによってコードされる蛋白に対して、約 10^{-6} Mより大きい結合親和性を有している、当該医薬の製造に使用する結合蛋白。

白が、配列番号1もしくは3またはその変種のDNAによってコードされる蛋白に対して、約 10^{-6} Mより大きい結合親和性を有している、当該医薬の製造に使用する結合蛋白。

明 細 書

新規な悪性細胞型内部核マトリックスマーカー

発明の背景

全ての真核細胞は(植物も動物も)、細胞質によって取り巻かれた核を有する。核は蛋白と複合体を形成し、クロマチンと呼ばれる細胞DNAを含んでいる。クロマチンはその付随蛋白とともに核全体の主要部分を構成し、本明細書で核マトリックス(NM)と呼ぶ核の内部蛋白骨格によって組織化されている。核マトリックスはまた、DNA分解酵素(DNアーゼ)1による消化と高濃度の塩による抽出によってクロマチンの除去後残存する核構造と定義される。この骨格核構造はさらに、“内部核マトリックス”(INM)および核孔板境界複合体によって特徴づけられる。

種々の研究は、NMが遺伝子発現の制御にとって重要な種々の核機能に本質であることを示している(概論については例えば以下を参照のこと:Feyら、(1991)Crit. Rev. Euk. Gene Express. 1:127-143)。特に、米国特許第4882268号および4885236号に記載されているように、一定の核マトリックス蛋白(特に内部核マトリックス蛋白)は、細胞型を同定するためのマーカー蛋白として有用である。例えば、特定のINM蛋白の存在および豊富さは特定の細胞型の特徴であり、サンプル中に存在する細胞または細胞断片の元の組織を同定するために用いることができる。本発明の特に重要な応用は、転移組織癌におけるマーカー-INM蛋白の使用である。また、一定のINM蛋白の

発現は、悪性またはそうでなければ機能不全細胞で変化する事が知られている。また、悪性および/または機能不全細胞におけるこれら蛋白の発現パターンの変化は、診断の目的および組織の生存度評価のために、核蛋白および核蛋白をコードする核酸を、単独または組み合わせでマーカー蛋白として有用なものにする。米国特許第4882268号および4885236号(特許日はそれぞれ11/21/89(Pennan)および12/5/89(Fey))は、細胞または細胞残片から不溶性INM蛋白およびその付随核酸を選択的に抽出し、二次元電気泳動ゲルでこの蛋白を明示することによって特定の細胞型におけるこれら蛋白の発現パターンを識別する方法を開示している。さらに、INM蛋白または蛋白フラグメントはまた、死細胞から可溶性で遊離させることができることが最近発見された(米国特許出願第785804号、1991年10月31日出願)。

今日まで、NM、特にINMの特定蛋白の分子の性状は、細胞内でこれら蛋白が僅かしか存在しないことと、一般にそれらは不溶性であることによって殆ど明らかにされていなかった。特定の核マトリックス蛋白およびそれらをコードする遺伝子配列を分離し、分子レベルで性状を決定することが可能となり、これら蛋白およびその核酸のマーカー分子としての使用を押し進め、さらにこれら蛋白のインビボでの生物学的役割の解明を促進することが期待される。

本発明の目的は、悪性細胞型のマーカーとして有用なINM蛋白をコードする遺伝子配列を提供することである。別の目的は、サンプル中のこれら蛋白およびその核酸(RNA転写物を含む)を同定する強力な方法を提供することである。本発明の

また別の目的は、診断および他の組織検査工程で使用する組成物を提供することである。さらにまた別の目的は、癌治療において標的分子として有用な遺伝子配列およびアミノ酸配列を提供することである。本発明のこれらおよび他の目的および特色は、以下の説明、図面および請求の範囲から明らかとなろう。

発明の要旨

2種の1NM蛋白のDNA配列データを含む分子の性状データを、これら蛋白の単クローン性抗体を用いて発現ライブラリーから得た。本明細書ではMT1およびMT2と呼ぶこの蛋白は、悪性組織および細胞外液に増加レベルで存在する。したがって、この蛋白およびそれらをコードする遺伝子配列は、細胞サンプルまたは体液サンプルにおいて組織の腫瘍発生を識別するマーカー分子として有用であると考えられる。

これら蛋白をコードする遺伝子の完全クローンまたは部分クローンを分離し、そのDNA配列、読み枠およびこれらDNAがコードするアミノ酸配列を決定した。MT2のDNA配列はヤンら(Yangら、(1992) J. Cell Biol., 116:1303-1317)およびコンプトンら(Comptonら、(1992) J. Cell Biol., 116:1395-1408)が開示した配列(それらの文献ではNuMAと呼ばれている)と対応する。本明細書ではMT1と呼ぶこの核酸(およびコードされたアミノ酸配列)は、以前に報告されたことはなく、当技術分野で既知の配列と殆ど配列相同性をもたない新規な配列である。さらに、MT1を発現ベクターでサブクローニングし、さらに大腸菌(*E. coli*)で切断可能な融合蛋白として発現させた。免疫蛍光法で認められたように、MT1およびMT2(NuMA)の両方は非有糸分裂細胞の核全体(仁を除く)

したがって、MT1系統の蛋白をコードする核酸は、厳しいハイブリダイゼーション条件下で配列番号1のDNA配列とハイブリダイズする配列と定義できる。本明細書で用いられているように、厳しいハイブリダイゼーション条件とは、分子クローニング:実験室マニュアル、マニアーティス編、コールドスプリングハーバー研究所出版部(1985)で規定されているようなもので、例えば、50%ホルムアミド、5×デンハルト溶液、5×SSPE、0.1%SDSおよび100μg/ml酸性サケ精子中でハイブリダイゼーションを行い、2×SSC、0.1%SDSで37℃で洗浄、さらに1×SSC、0.1%SDSで68℃で洗浄という条件である。

MT2と定義される系統の蛋白は、配列番号3の核酸配列(その類似体を含む)によってコードされる蛋白を含む。この類似体には対立遺伝子の変種および変異種、並びに他の天然および人工の変異種を含む。これらの変種は生物学的活性および不活性蛋白形を含む。特に想定されるものは、サイレント変異を有するDNA、他の好ましいコドンの使用および保存的アミノ酸変化をコードするDNAである。本発明のMT2蛋白系統をコードする核酸は、厳しいハイブリダイゼーション条件下で配列番号3のDNA配列とハイブリダイズするDNA配列と定義できる。

別の特徴では、本発明は、MT1をコードする遺伝子配列とハイブリダイズする(しかし必ずしも機能的な蛋白をコードするとは限らない)核酸フラグメント("オリゴヌクレオチド"または"オリゴマー")を提供する。このオリゴヌクレオチドはMT1系統の蛋白に含まれる蛋白をコードする遺伝子配列を

に分布し、有糸分裂中は紡錘体に局在する。

本明細書で述べる遺伝子配列は、MT1およびMT2蛋白(MT1およびMT2の対立遺伝子変種および変異種を含む)の各々の蛋白の1系統を提供する。この系統の蛋白は、リコンビナント(組換え体)DNA、DNA自体さらにこれらの核酸をもちそれを発現できる宿主細胞から宿主細胞での発現によって産生される蛋白を含む。組換え体によって産生された蛋白は、標準的な方法、例えばアフィニティークロマトグラフィーを用いて分離し、実質的に純粋な蛋白を得ることができる。本明細書で用いられているように、"実質的に純粋"とは、望ましくない夾雑蛋白物質を実質的に含まないことを意味すると解される。

MT1と定義される蛋白の系統は、配列番号1の核酸配列(その類似体を含む)によってコードされる蛋白を含む。本明細書で用いられているように、"類似体"とは、対立遺伝子の変種および変異種、並びに他の天然および人工の変異種を含むと理解される。これらの変種はこの蛋白の生物学的活性形および不活性形を含む。特に想定されるものは、種々の好ましいコドンの使用方法を有するDNA、配列番号1のDNAの"サイレント変異"を有するDNA(この場合遺伝子配列の変化はコードされるアミノ酸に影響を与えない)、およびデオフラ(Dayoffら、「蛋白配列と構造図録」(Atlas of Protein Sequence and Structure) 5巻、付録3、345-362(M. O. Dayoff編、Nat'l Biomed. Research Foundation, ワシントンD.C., 1979)が定義したような"保存的"アミノ酸変化をコードするDNAである。

cDNAまたはゲノムDNAライブラリーから分離するために、および/または、MT1蛋白をコードする配列と自然の状態で付随している遺伝子配列を識別するためのプローブ(例えばそのコード配列の上流または下流に存在する配列)を提供する。例えば、この核酸フラグメントがMT1系統の他の蛋白を同定するプローブとして用いられる場合、この核酸フラグメントは誘型として配列番号1の配列を用いてデザインされた、"分子クローニング:実験室マニュアル"(マニアーティス編、コールドスプリングハーバー研究所出版部、1985)に記載されている縮重配列であってもよい。したがって、オリゴヌクレオチドまたは核酸フラグメントは配列番号1のDNA配列の全部もしくは一部を含んでもよく、また配列番号1のDNA配列に基づいて生合成した配列であってもよい。このオリゴヌクレオチドは、通常の標識技術を用いて好ましくは適切に標識される。

オリゴヌクレオチドはまた、MT1蛋白をコードするmRNA転写物とハイブリダイズする配列を含む。この相補的配列は当技術分野および本明細書ではアンチセンス配列と呼ぶ。アンチセンス配列は、配列番号1の配列の全部もしくは一部を含んでもよく、また配列番号1のDNA配列を誘型として用いてデザインした生合成配列であってもよい。

さらに別の特徴として、本発明は、MT2蛋白系統の蛋白をコードする遺伝子配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを提供する。このフラグメントには、アンチセンス配列および、MT2系統の蛋白を同定し、および/または付随非コード配列を同定するためのプローブとして有用な配列が含まれる。

ハイブリダイズする核酸は、配列番号3の配列の全部もしくは一部を含んでいてもよく、また配列番号3のDNA配列を誘型として用いてデザインした生合成配列であってもよく、通常の遺伝子工学を用いて好ましくは適切に複製される。

本明細書で同定される遺伝子配列は、組織の悪性度または他の細胞機能不全を示唆するマーカー蛋白として識別される蛋白をコードする。したがって別の特徴では、本発明は、本明細書に開示する蛋白を適切なアジュバントと組み合わせて用いて、サンプル中の癌マーカー蛋白を検出するために有用な抗体を得るための組成物を提供する。別の特徴では、本発明は、これらの蛋白をコードするmRNA転写物と特異的にハイブリダイズする配列をデザインするための遺伝子誘型を提供する。また別の特徴では、本発明は、MT1またはMT2のエピトープと特異的に反応する結合蛋白(抗体を含む)をデザインするために、蛋白および蛋白フラグメントを発現させるときに使用する分離DNA配列を提供する。本発明はまた、本明細書で開示した遺伝子配列およびそれらによってコードされるマーカー蛋白を用いた、組織の状態の検査方法を提供する。最後に、本発明は、細胞の分裂する能力を抑制または不可能にするために、これらマーカー蛋白またはそれらをコードする遺伝子配列を標的分子として個々に用いる、悪性疾患を治療する方法を提供する。

図面の簡単な説明

図1A-1Dは、以下の通り配列番号1のMT1のアミノ酸配列を示す模式図である：

図1A：プロリン残基の位置；

図1B：配列内の α ヘリックスと規定される領域；

する配列は、先に報告された配列と殆ど相同性を共有しない配列を構成することが示された。

MT1をまた大腸菌で切断可能な融合蛋白として発現させ、哺乳類細胞から分離した蛋白と比較した。天然由来MT1蛋白に対する抗MT1抗体もまた、組換え体で産生させた蛋白と交差反応を示した。天然由来蛋白および組換え体産生蛋白の両方とも、SDS-PAGEで調べたとき同じ見かけの分子量(90 kD)と同等のpI値(5.4)を有し、さらに両蛋白とも2-ニトロ-3-チオシアノ安息香酸(NTCB、下記参照)による切断で同じ切断パターンを示す。

MT1の免疫的局在化実験によるデータでは、MT1蛋白は、非有糸分裂細胞のINM内に限局性の斑点状濃縮として、INMの核質全体に不均一に分布している。特に、この濃縮は核のクロマチン間に存在し、内部核マトリックス蛋白として予想通り、クロマチン抽出後も残存する安定な結合として分布する。さらに、MT1濃縮は仁および核膜からは排除されている。のみならず、有糸分裂中にMT1の分布は変化し、分裂細胞の紡錘体に星型模様として配列される。この蛋白はクロモソームと共同して一定の部位を占めることはないが、これはMT1は有糸分裂中に構造的役割を果たしている可能性を示唆する。免疫的局在化実験のデータは、いずれの既知DNA結合モチーフ(例えばロイシンジッパー)とも構造的相同性を見出すことができないMT1アミノ酸配列分析データと一致する。

MT2(NuMA)蛋白は組換え体で発現されていないが、一方、この蛋白の予想分子量238 kDa(推定アミノ酸配列(配列番号3参照)から算出)は天然由来物質のそれと適合す

図1C：システイン残基の位置；

図1D：NTCBの切断部位。

図2A-2Bは、以下の通り配列番号3のMT2の7アミノ酸配列を示す模式図である：

図2A：プロリン残基の位置；

図2B：配列内の α ヘリックスと規定される領域。

図3は、種々の正常および悪性組織サンプル上清中で測定された体液可溶性MT2およびMT2関連蛋白量を示す。

図4は、癌患者および正常血液供与者から分離された血清中で測定された体液可溶性MT2およびMT2関連蛋白量を示す。
発明の詳細な説明

生物アッセイにおいて悪性細胞マーカーとして有用なINM蛋白の性状を調べる試みで、2種のINM蛋白をコードする遺伝子配列(本明細書ではMT1およびMT2と呼ぶ)を同定し性状を調べた。これら蛋白をコードするDNA配列を、分離INM蛋白MT1およびMT2に対する単クローン性抗体を用いて発現ライブラリーを検索することによってクローニングした。この蛋白は、実質的にはペンマンとフェイの方法(Pennan & Fey, 米国特許第4882268号および4885236号、この文献は参照により本明細書に含まれる)にしたがい、悪性細胞から分離した。クローニングしたDNAを続いて配列を調べ、その読み枠を同定し分析した。MT2をコードする遺伝子配列は、他の者によって開示され(Yangら、(1992)J. Cell Biol. 116:1303-1317 およびComptonら、(1992)J. Cell Biol. 116:1395-1408)、彼らによって"NuMA"と呼ばれている。MT1およびMT2と当技術分野の他の配列との比較によって、これら蛋白をコード

る。

MT2(NuMA)の免疫的局在化実験は、この蛋白もまた、非有糸分裂細胞の核質全体に存在する斑点状濃縮を形成し、また仁から排除されていることを示している。有糸分裂中、この蛋白は分裂細胞の紡錘体の極に移動するようである。その一次配列は折り畳まれた蛋白のためのコイルドコイル(coiled-coil)モチーフを示唆しているようである(Comptonら、(1992)J. Cell Biol. 116:1395-1408; Yangら、(1992)J. Cell Biol. 116:1303-1317)。

1. 使用方法

本明細書で開示される核酸は、細胞の悪性度または他の細胞異常性を識別するために有用なマーカー蛋白として本来区別される蛋白をコードする。特異的に、これら蛋白レベルの顕著な増加が悪性細胞および癌患者の細胞外液(例えば血清)中で検出される(PCT 公開公報W093/09437および下記参照)。例えば、細胞または細胞核残屑を含むサンプル中のこれら蛋白またはその転写物の存在および/または豊富さは、与えられた組織が悪性細胞または他の異常性(例えば染色体異常)を有する細胞を含んでいるか否かを決定するために用いることができる。このサンプルは別個細胞サンプルまたは体液サンプル、例えば血液、血清、血漿、尿、精液、腔分泌物、髄液、唾液、涙水、腹腔液、痰、組織ぬぐい液、生体滲出物(例えば乳房滲出物)を含むサンプルでもよい。

さらに、INM蛋白は死細胞から可溶形で遊離するので、マーカー分子は対象となる組織の生存度を調べるために用いることができる。例えば、マーカー蛋白は、時間経過にしたがって

これらマーカー分子の体液中への遊離をモニターすることによって、病状または治療措置もしくは方法の有効性を調べることができる。特に有用な体液は、血液、血清、血漿、尿、精液、腫分泌物、髄液、唾液、膿水、腹腔液、痰、組織ぬぐい液、および生体渗出物（例えば乳房渗出物）である。これらのアッセーを実施する方法は、米国特許第4882268号および4885236号並びに米国特許出願第214022号（1988年6月30日出願）および同785804号（1991年10月31日出願）（これら文献はすべて参照により本明細書に含まれる）に開示されている。

これらアッセーのすべては以下の一般的な操作工程の特徴を有する：

1) “本物”のサンプルまたはリファレンスサンプル中のマーカー蛋白またはその転写物の存在および/または豊富さを検出する；

2) 問題のサンプル中のマーカー蛋白またはその転写物の存在および/または豊富さを検出する；

3) 問題のサンプル中のマーカー蛋白またはその転写物の量とリファレンスサンプル中の量とを比較する。

組織の生存度をモニターするためにこのアッセーを用いる場合、問題のサンプル中のマーカー蛋白またはその転写物の存在もしくは豊富さを検出する工程は間隔をおいて繰り返し、続いてこれらの値を比較する。検出濃度の変化は組織の状態における変化を反映している。治療の有効性を調べるためにこのアッセーを用いる場合は、モニター工程は、治療薬剤または治療法を施した後で実施する（例えば化学治療剤の投与後または放射線照射治療後）。

さらに、正常および異常組織で産生される蛋白間の構造および/または配列変動を解明し、利用することができる。遺伝子配列は、当技術分野で既知の標準的な組換え体DNA操作を用いて所望するように、例えば切り詰め、変異を起こさせるなどして操作し、抗体産生に有用な所望の特徴をもつ蛋白を得ることができる。

当業者には理解されるところであるが、問題のマーカー蛋白を特異的に識別し定量するいずれの方法も利用できる。サンプル中の問題の蛋白を検出する目下の好ましい手段は、マーカー蛋白と特異的に反応することができる結合蛋白を手段とするものである。標識抗体、また特にその結合部分を有利に用いることができる。抗体は本来単クローン性抗体でも多クローン性でもよく、また生合成的に製造してもよい。マーカー蛋白複合量、例えば結合蛋白に結合するマーカー蛋白量は、続いて当技術分野でよく知られている標準的な蛋白検出方法を用いて決定される。

A. 1. 免疫アッセー

異なる種々の免疫アッセー形が目下のところ存在するが、それらのいずれもINM蛋白およびその蛋白フラグメントを検出し定量するために利用することができる。例えば、初級細胞サンプルについては、細胞および周囲の液体を採集し、INM蛋白はベンマンとフェイの方法（米国特許第4882268号および4885236号）によって選択的に分離する。続いてこれらの蛋白を好ましくは二次元ゲル電気泳動によって分離し、マーカー蛋白の存在を標準的ウェスタンブロット方法によって検出する。

検出されるべきマーカー蛋白および/または蛋白フラグメン

特定のINMマーカー分子が標的細胞型に存在し、他には存在しないという意味で、選択マーカー蛋白または転写物は全体的に固有のものである必要はない。むしろ、マーカー分子は、サンプル中のそのためにアッセーをデザインした予め選んだ細胞型を識別するために十分高いノイズ比の信号を有することが要求される。例えば、MT1およびMT2蛋白は、たとえその蛋白またはその密接な類似体が非悪性細胞型に普通に存在しているとしても、悪性細胞におけるそれらの発現のレベル上昇のゆえに、細胞サンプル中の悪性性の存在を示す蛋白として有用である。

一般的な蛋白および核酸分析の考察についての簡単な説明を以下に述べる。特定のアッセー条件の詳細は上記のアッセーの参考文献（これらは参照により本明細書に含まれる）および当技術分野で周知の公表されたプロトコル（これらは容易に入手できる）で見出すことができる。

A. 蛋白アッセー

本明細書で開示するように、分子レベルでのMT1およびMT2蛋白の性状決定によって、該蛋白を構造的および生化学的に性状を調べることが可能になった。したがって、これらの遺伝子配列とそれらがコードするアミノ酸配列の開示に続き、アッセー条件を強化するために用いることができる、好ましい結合エピトープを同定することができる。例えば、結合蛋白は、特定の細胞型によって産生されるマーカー蛋白、または特定の悪性機能としてのマーカー蛋白に対する親和性を強化するようにデザインできる。同様に、結合蛋白は、死細胞から遊離される蛋白フラグメントに優先的に結合するようにデザインできる。

トが主に溶液中に存在する血清および他の液体アッセーでは、目下のところ最も鋭敏な免疫アッセー様式はサンドイッチ法である。典型的には±5%の正確さをもつこの方法では、PCT公開公報W093/09437号に開示されているように、一般に問題の被分析物と結合することができる2つの抗体が用いられる：例えば1つは固形支持体に固定され、他は溶液中に遊離しているがなんらかの容易に検出できる化学化合物で標識されている。第二の抗体のために用いることができる化学標識の例には、放射性同位元素、蛍光化合物および酵素、または、反応物もしくは酵素基質に接触させたとき着色生成物もしくは電気化学的に活性な生成物を生じる他の分子が含まれる。マーカー蛋白またはその蛋白フラグメントを含むサンプルをこの系に投入するとき、マーカー蛋白は固定抗体および標識抗体の両方に結合する。結果は、支持体表面上の“サンドイッチ”免疫複合体である。この複合体蛋白は、非結合サンプル成分および過剰の標識抗体を洗い流し、支持体表面の蛋白と複合体を形成した標識抗体の量を測定することによって検出される。サンドイッチ免疫アッセーは、優れた検出限界をもつ標識を用いるならば、極めて特異的かつ非常に鋭敏である。免疫学的アッセーのデザイン、理論およびプロトコルの詳細な総論は、「免疫学の実践」(Practical Immunology) W. R. Butt 編、Marcel Dekker、ニューヨーク、1984)を含む当技術分野の多数の成書に見出すことができる。

一般に、免疫アッセーのデザインの考察は抗体（例えば単クローン性抗体または多クローン性抗体）の調製を含むが、この抗体は、特異的に結合した抗原-抗体複合物を非特異的相互反

応から信頼性をもって区別できる、それら抗原に対して十分に高い結合特異性を有する。本明細書で用いられるように、「抗体」とは、マーカー蛋白に対して適切な結合親和性および特異性を有する他の結合蛋白を含むと考えられる。抗体の結合特異性が高ければ高いほど、検出できる抗原濃度は低くなる。目下のところ、好ましい結合特異性は、該結合蛋白がマーカー蛋白に対して約 $10^8 M^{-1}$ よりも大きい、好ましくは約 $10^9 M^{-1}$ よりも大きい結合親和性を有するようなものである。

抗体結合ドメインはまた、生合成的に製造でき、結合ドメインのアミノ酸配列を操作して好ましいエピトープで結合親和性を強化することができる。MT1およびMT2の遺伝子配列の同定は、好ましい結合蛋白のデザインと構築に有利に用いることができる。例えば、好ましいエピトープをコードするDNAは組換え体によって発現させ、選択的にこのエピトープと結合する抗体を選択するために用いることができる。続いて、その特異的核マトリックス蛋白もしくは蛋白フラグメントに該抗体を特異的に結合させるに十分な条件下で選択抗体をサンプルと接触させ、形成された複合体の量をその後検出する。特異的な抗体についての方法論は周知であり、文献に記載されている。その調製についてのより詳細な記載は、例えば「免疫学の実験」(Practical Immunology) W. R. Butt 編、Marcel Dekker、ニューヨーク、1984)で見出すことができる。

標識の選択はまた所望の検出限界に依存する。酵素アッセイ(ELISA)は典型的には、酵素標識複合体と酵素基質との相互作用によって形成された着色生成物を検出させる。別の標識には、放射性または蛍光標識が含まれる。今日までに知られ

ている最も敏感な標識は化学発光標識であるが、この場合、反応物との相互作用は光の発生をもたらす。有用な標識には化学発光分子(例えばアクリジウムエステル)または化学発光酵素(この場合反応物は酵素基質である)が含まれる。例えば、アクリジウムエステルが過酸化アルカリ溶液と反応するとき、強い閃光が放出され、他の標識で得られる検出限界よりも100から10000倍まで検出限界を増加させる。さらに、この反応は迅速である。化学発光および免疫アッセイの詳細な説明はウィークスらの成書で見出される(Weeksら、(1983)「酵素学的手法」(Methods in Enzymology) 133:366-387)。液体アッセイの他の考案には、マイクロタイター(穴)ウェルまたはカラム免疫アッセイの使用が含まれる。カラムアッセイは、迅速に反応する標識、例えば化学発光標識を用いる場合は特に有利である。標識複合体はポストカラム検出器に溶出できるが、これには、また反応物または酵素基質が含まれ、続いて形成される生成物を直ちに検出することが可能である。

A. 2. 抗体製造

本明細書で開示する蛋白は、周知で当技術分野で記載されている標準的な免疫学的方法を用いて抗体を産生させるために使用することができる(例えば、「免疫学の実験」(W. R. Butt 編、Marcel Dekker、ニューヨーク、1984)を参照)。簡単に記せば、例えば宿主細胞で組換え体DNAを発現させることによって製造した分離INM蛋白を、異種宿主で抗体を産生させるために用いる。好ましい抗体は、該蛋白上のエピトープと特異的に結合する抗体(エピトープに対して好ましくは $10^8 M^{-1}$ より大きい結合親和性、最も好ましくは $10^9 M^{-1}$ より大きい

結合親和性を有する)である。例えば、ヒトINM蛋白(例えば、MT1またはMT2)に対する抗体を所望する場合は、適切な抗体を生じる宿主は、マウス、ヤギ、ウサギ、モルモットまたは抗体産生に有用な他の哺乳類である。該蛋白は、宿主において抗体産生を強化することができる適切なアジュバントと合体させ、例えば腹腔内投与によって宿主に注射することができる。宿主の免疫反応を刺激するために適切ないずれのアジュバントも便宜のために用いることができる。目下のところ好ましいアジュバントは、フロイントの完全アジュバント(殺菌し乾燥させた微生物細胞を含む乳濁液[例えばカルビーオケム社(サンディエゴ)またはギブコ社(グランドアイランド、ニューヨーク)]である。抗原の複数回注射が望まれる場合は、後の注射は不完全アジュバント(例えば細胞非含有乳濁液)と混合した抗原を含む。

多クローン性抗体は、抗体産生宿主から問題の蛋白に対する抗体を含む血清を抽出することによって分離することができる。単クローン性抗体は、所望の抗体を産生している宿主細胞を分離し、免疫学分野で既知の標準的方法を用いてミエロマ細胞とこれらの細胞を融合させ、さらに特異的にINM蛋白と反応し所望の結合親和性を有するハイブリッド細胞(ハイブリドーマ)をスクリーニングすることによって製造することができる。

以下に提供するのは、目下のところ好ましい単クローン性抗体産生プロトコルの実施例である。他のプロトコルもまた意図される。したがって、本発明の底マーカー蛋白組成物に対して特定の抗体製造方法が、本発明の特徴として意図されるわけではない。また下記に述べるものは、サンプル中のマーカー蛋白を

検出および/または定量するために有用なサンドイッチ免疫アッセイおよびドットプロットアッセイの実施例である。マーカー蛋白(特にMT1、MT2およびその類似体でその蛋白フラグメントおよび自然に発生する変種を含む)を検出する他の手段も意図される。これらの他の方法は周知で、当技術分野で記載されている。

例示的抗体産生プロトコル: Balb/c x Jマウス(ジャクソンラボラトリー、バーハーバー、メーン)に、ヒト子宮頸癌細胞株(CaSkI)から精製した精製INM蛋白(例えばMT1)を16週間の間2週間毎に腹腔内に注射する。マウスに殺処分4日前に1度だけ追加免疫を注射し、脾臓を摘出する。最初の注射ではフロイントの完全アジュバント(ギブコ、グランドアイランド)を用い、2度目の注射ではフロイントの不完全アジュバントを用い、その後の注射は食塩水で実施する。脾臓細胞(またはリンパ節細胞)を続いて文献の方法(Kobler & Hillestein (1975) Nature 255:495(この文献は参照により本明細書に含まれる))を用い、ポリエチレングリコール(PEG:ペーリンガーマンハイム、ドイツ)でマウスミエロマ細胞株と融合させる。その後、核マトリックス蛋白と反応する抗体を産生しているハイブリドーマをクローニングし、腹水として増殖させる。免疫学分野で既知の標準的な方法を用いて、当該免疫原が由来した細胞株に対する核反応性と組織免疫化学によってハイブリドーマをスクリーニングする。スクリーニングプロトコル、腹水製造および免疫アッセイもまた、PCT公開公報W093/09437号に記載されている。

例示的アッセイ:

A. サンドイッチ免疫アッセイ (ELISA)

抗原結合用、交差反応分析用、およびモニターアッセイ用のドーズ・レスポンス曲線を作製するために標準的免疫アッセイを実施することができる。データはNM抗原の標準的調製物をもちいて作製し、体液分析時に参考標準物として用いる。これらの実施例ではELISAも放射性免疫アッセイも実施した。

1. 免疫アッセイ (ウェルアッセイ)

マイクロタイタープレート (イムロンII、ダイナテック、シャンティリー、バージニア) を5から15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (PBS中、pH7.4)の精製抗体で1時間または一晩被覆し、その後300 μl のPBSで3度洗浄する。続いてプレートをPBS中の10%正常ヤギ血清で1時間室温でブロックし、さらに300 μl のPBSで3度洗浄する。プロトコルの1例を下記に示す。

ここではウェルにつき100 μl のサンプルをピペットでとり、室温で1時間保温して分析する。ウェルを300 μl のPBSで3度洗浄した。1.25から10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のビオチン化抗体100 μl を各ウェルに加え、室温で1時間保温し、300 μl のPBSで3度洗浄した。1:1000倍希釈のストレプトアビジンセリウムワサビペルオキシダーゼ複合物 (バインディングサイト社、バーミンガム、イギリス) 100 μl を各ウェルに加え、1時間保温し、続いてPBSで洗浄した。その後、100 μl のペルオキシダーゼ基質 (クエン酸塩、過酸化水素、OPD-H₂O₂) を各ウェルに加え、20分保温する。50 μl の1M硫酸をウェルに加えて反応を停止させる。光学密度をプレートリーダーで490 nmで読み取る。

をELISAアッセイのように被覆し、さらにブロックする。サンプル (標準物または血清) を日常的に以下のように測定する。ウェル中で100 μl を室温で1時間保温し、プレート洗浄器を用いて300 μl のPBSで3度洗浄し、続いてビオチン化抗体 (10%ヤギ血清中の2-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で1時間室温で保温し、再び洗浄する。結合ビオチン化抗体を¹²⁵I-ストレプトアビジンで検出する。100 μl の200000から300000 cpm (77%計測効率) を各ウェルに加え、1時間室温で保温し、再び洗浄する。結合分画をLKBガンマカウンターで放射能活性を計測して検出する。濃度をリファレンス調製物について得たカウントと比較して求めることができる。

B. NMのドットプロット検出

NM蛋白と抗体の反応性は、標準的方法と装置 (例えばSchleicher & Schuell) を用いてドットプロット検出アッセイで調べることができる。ニトロセルロース膜をトリス緩衝食塩水 (TBS, 50mM TRIS, 150mM NaCl, pH7.6) に浸し、一連のウェルに対して種々の蛋白濃度のNM調製物で処理し、室温で1時間保温する (例えば、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ および100 ng/mlのT-47DNM上清)。続いてブロックしたウェルを200 μl のTBSで2度洗浄し、その後TBS中100 μl の10%正常ヤギ血清で1時間室温でブロックする。続いてブロックしたウェルを200 μl のTBSで2度再び洗浄し、検活性抗体を含む被験培養上清100 μl をそれぞれのウェルに加え、室温で1時間保温する。その後ウェルを200 μl のTBSで2度洗浄し、アルカリホスファターゼ結合ヤギ抗マ

未知サンプルと比較するために、リファレンス濃度の抗原を調製して標準希釈曲線を調製することによって抗原濃度を決定する。

2. IRMA (放射性免疫測定アッセイ)

(a) ストレプトアビジンのヨード化

2 μl の0.05M過酸化水素 (pH7.4) 中の10 μg のストレプトアビジン (シグマ社、シンシナチ) を微量遠心管中の10 μl の0.25M過酸化水素 (pH7.4) に加え、10 μl の1mCiの¹²⁵I (NEN-DUPONT、ウィルミントン、デラウェア) を加える。直ちに50mlの蒸留水中の100mgクロラミン-T三水合物 (シグマ社) 10 μl を加え、混合し2.5秒間反応させる。続いて40mgのシステアミン (2-メルカプトエチルアミン、シグマ社) 50 μl 、および0.05Mの過酸化水素 (pH7.4) 50ml中の5mg KIを20秒間混合して反応を停止させる。PBS (pH7.4) 中の1%BSA 0.5mlを加え、材料を予めBSA/PBS緩衝液で平衡化した10mlのセファデックスG-100カラム (ファルマシア、スウェーデン) で分画した。0.5ml×30の分画を採集し、各分画の10 μl を1mlにBSA/PBSで希釈する。希釈した分画の100 μl を¹²⁵I用LKBガンマカウンターで計測する。比活性を計算し、通常85から100 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ の間になった。蛋白ピークの中央の分画をその後サンドイッチ免疫アッセイに用いる。

(b) サンドイッチ放射性免疫アッセイ

マイクロタイター分離式ウェル (イムロンII リムーバブルストリップ、ダイナテック、シャンティリー、バージニア)

ウス1 μg の段階希釈100 μl (バイオラッド社、リッチモンド、カリフォルニア) (例えば1:1000、1:5000、または1:10000) をそれぞれのウェルに加え、さらに1時間保温する。続いてウェルを200 μl のTBSで2度洗浄し、さらにレバミゾール (ベクター社、Corpus Christi、テキサス) を含むトリス緩衝液中の酵素基質 (BCIP/NBT, Kirkgaard & Perry, Gaithersburg、メリーランド、例えば100 μl) を加える。一般に15分の保温で十分である。反応は蒸留水で洗浄して停止させ、精製物を検出することができる。

B. 塩酸分析

これらの癌マーカー蛋白をコードする転写物の量を検出することによって、組織の状態を決定することもまた可能である。これまでのところ、mRNAを検出する好ましい手段は、標的オリゴヌクレオチド (例えば問題の転写物と特異的にハイブリダイズできる核酸フラグメント) を用いるノザンプロット分析手段である。これまでのところ好ましいオリゴヌクレオチド配列は、マーカー配列転写物の少なくとも一部分と相補的な配列をコードする配列である。これらの相補的な配列は、"アンチセンス" 配列として当技術分野では既知である。このオリゴヌクレオチドはオリゴリボヌクレオチドまたはオリゴデオキシリボヌクレオチドであろう。さらに、オリゴヌクレオチドは天然オリゴマーであり、生物学的に重要なヌクレオチド (すなわちA (アデニン)、dA (デオキシアデニン)、G (グアニン)、dG (デオキシグアニン)、C (シトシン)、dC (デオキシシトシン)、T (チミン)、U (ウラシル))、または例えばヌクレオチド間のホスホジエステル結合内のホスフェート酸基

をメチル基または硫黄原子に置き換えた修飾オリゴヌクレオチド種で構成される(例えば下記の1、C章を参照)。さらに、このヌクレオチド自体および/またはそのリボース部分も修飾されているかもしれない。

この配列は、当技術分野でよく記載されている既知の化学的オリゴヌクレオチド合成方法のいずれかを用いて化学的に合成できる。例えば、オリゴヌクレオチドは有利には、市販のいずれかの自動核酸合成装置を用いて調製することができる。また別に、オリゴヌクレオチドは標準的な組換え体DNA技術、例えば非コード領域の転写を誘発することによって製造することができる。例えば、マーカー蛋白をコードするDNA配列は、組換え体DNA系で逆逆することができる。例えば、非コード領域が転写されるように、適切なプロモーターの下流に逆方向に挿入できる。

有用なハイブリッド形成オリゴヌクレオチド配列は、MT1またはMT2一次転写物と特異的にハイブリダイズすることができるいずれの配列も含む。したがって、当業者には理解されるように、包含される有用な配列は配列番号1(MT1)または配列番号3(MT2)(MT1およびMT2は蛋白コード領域と一致する)で提供されるDNA配列だけでなく、当該コード配列からさらに上流もしくは下流にある転写配列(例えば5'および3'非翻訳領域に含まれるか、または該領域にまで延びる配列)と相補的な配列の両方を含む。代表的なアンチセンス配列は配列番号5および6に記載されている。配列番号5は、MT1蛋白コード配列の最初の100ヌクレオチドだけでなく、開始コドンの上流にある53ヌクレオチド配列と相補的な配列

を表している。開始コドンと相補的なヌクレオチドは、配列番号5の298-300位にある。同様に、配列番号6は、MT2蛋白コード配列の最初の100ヌクレオチド(配列番号3および6と比較のこと)だけでなく、開始コドンの上流にある48ヌクレオチドと相補的な配列を示す。開始コドンと相補的なヌクレオチドは配列番号6の298-300位にある。有用なオリゴマーは、配列番号5および6の配列の一部分またはすべてを基本として作製することができる。しかしながら、当業者には理解されるところであるが、該転写物の他の領域とハイブリダイズする他の有用な配列も、配列番号1および3、および/または別の非翻訳配列(例えばコンプトンら(Comptonら)およびヤンら(Yangら)のMT2(NuMA)について開示されたようなもの)に存在する配列に基づいて容易に作製される。

いずれの長さのオリゴヌクレオチドもmRNA転写物とハイブリダイズさせるために用いることができるけれども、8-15ヌクレオチドより短い配列は、標的mRNAとハイブリダイズするとき特異性が低いかもしれない。したがって、典型的には8-100ヌクレオチド以内のオリゴヌクレオチド、好ましくは15-50の範囲内のヌクレオチドが、標準的なRNAハイブリダイゼーションアッセイで最も有用であろうと考えられる。

1NM転写物とハイブリダイズさせるために選択されるオリゴヌクレオチド(化学的に合成されるか、組換え体DNAで合成されるかに拘わらず)は、続いて標準的技術を用いて単離、精製され、さらに標準的微量プロトコルを用いて好ましくは(例えば³²Sまたは³²Pで)標識される。

のこと。

C. 治療法

本明細書で開示する蛋白は有糸分裂中の紡錘体装置に付随し、悪性細胞で量が増加する。したがって、特定の理論に拘束されなければ、これらの蛋白は細胞分裂において重要な役割、おそらくは構造に関する役割を果たしているであろうと仮定できよう。したがって、これらの蛋白およびその転写物は癌の化学療法のための標的分子として好ましい候補であろう。

C. 1 アンチセンス治療

想定される特に有用な癌治療法は、マーカー転写物の部分または全てと相補的なオリゴヌクレオチドであるが、これは、該転写物に特異的にハイブリダイズすることができ、mRNA転写物とハイブリダイズするとき、該mRNAの翻訳を抑制することができる。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、正常および異常細胞の遺伝子発現を抑制するために広く用いられてきた[例えば、アンチセンス理論関係の総論としてはステインらの文献(Steinら、(1988)Cancer Res. 48:2659-2668)、および既存のプロトコルを参照のこと]。したがって、MT1およびMT2に対するアンチセンスヌクレオチドを化学療法の一部として、単独または他の治療と組み合わせる用いることができる。

上記の1、B節で述べたように、オリゴヌクレオチドおよびオリゴデオキシヌクレオチド配列の両方とも、mRNA転写物とハイブリダイズし、本明細書で開示するマーカー蛋白のmRNA翻訳を抑制するために用いることができるであろう。しかしながら、一般にオリゴヌクレオチドはデオキシリボ

問題のマーカー転写物を含むサンプルを続いて電気泳動ゲルで流し、分散させた核酸をニトロセルロースフィルターに移し、標識オリゴヌクレオチドを適切なハイブリダイゼーション条件下で該フィルターと接触させる。ハイブリダイゼーション条件は、「分子クローニング：実験室マニュアル」(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)、(マニアーティスら)に記載されているように、例えば、50%ホルムアミド、5×SSPE、2×デンハルト溶液、0.1% SDS、42℃である。当技術分野で既知の他の有用な方法は、溶液ハイブリダイゼーション並びにドットおよびスロットRNAハイブリダイゼーションを含む。続いて、サンプルに存在するマーカー転写物の量を、当技術分野で既知の標準的方法を用いてハイブリダイズしたフラグメントの放射能活性を測定することによって定量する。

同様なプロトコルにしたがって、またMT1およびMT2蛋白系の種類をコードする(例えば以下の実施例で述べるように)他の配列を同定するために、オリゴヌクレオチドを用いることができる。この方法論は、本明細書で開示する蛋白コード配列に関連する遺伝子配列を同定するために、例えば該蛋白コード配列の上流または下流に存在する非コード配列で、これら遺伝子の発現に機能的な役割を果たす可能性があるものを同定するためにもまた用いることができる。新規なマーカー種を同定する場合には、縮重配列および/または好ましいコドンバイアスをもつ配列を、精製して配列番号1または3の配列を用い、さらに縮重を取り除く当技術分野で開示されている一般的ガイドラインを使用して作製することができる。[例えば「分子クローニング：実験室マニュアル」(マニアーティスら)を参照

スクレオチドよりリボスクレアーゼによる酵素攻撃に感受性が高い。したがって、オリゴデオキシリボスクレオチドが、各患者のmRNA翻訳を抑制するインビボ治療の使用には好ましい。

また上記1. B節で述べたように、治療的に有用な本明細書発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、当技術分野でよく記載されている既知の化学的オリゴヌクレオチド合成のいずれによっても合成できる。また別に、天然のmRNA配列の一部またはすべてと相補的な配列は、標準的な組換え体DNA技術を用いて作製することができる。例えば、この蛋白コード配列をコードするDNAは、該配列を発現することができるプロモーターの下流に逆方向に、この非コード鎖が転写されるように挿入することができる。

この蛋白コード配列の完全なスクレオチド配列は、その付加5'および3'非翻訳配列と同様、MT1およびMT2の両方について既知であり(例えば配列番号1および2、並びにコンプトンらの文献を参照のこと)、さらにまた本開示を用いて決定することができるので、これら蛋白のmRNA転写物のいずれの部分ともハイブリダイズすることができるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、当業者が既知の慣用的なオリゴヌクレオチド合成方法を用いて調製することができる。

MT1およびMT2のmRNA転写物のいずれかの部分と相補的で、かつハイブリダイズすることができるオリゴヌクレオチドは、本明細書で開示するように転写物の翻訳抑制に概ね有効である。例えば、米国特許第5098890号(1992年3月24日発効、この文献は参照により本明細書に含まれる)に開示されるように、その翻訳開始コドン部位、またはその近くのmRNA

オチド、好ましくは15-30ヌクレオチドの範囲内の長さを有するオリゴヌクレオチドが最も有利であると想定される。

アンチセンス配列を標的細胞に与える別の手段は、遺伝子治療技術の一部として、例えば、標的細胞内で好ましくは構造的にアンチセンス配列の発現が可能なプロモーターを伴うDNA配列(好ましくはベクターの一部)として存在する。最近、エーラーら(Oellerら、Science (1992)、254:437-539;この文献は参照により本明細書に含まれる)は、完全な長さのACCシンターゼ転写物のアンチセンス配列をコードする構造的に発現が可能なDNA配列を用いてACCシンターゼのインビボ抑制を報告した。したがって、アンチセンス配列が標的細胞に間接的に提供される場合、例えば細胞内で発現される発現可能な遺伝子配列部分として提供される場合は、蛋白コード配列の実質的に全てに相補的な配列を含むより長いオリゴヌクレオチド配列を用いるのが有利であろう。

最後に、上記の1. B節でもまた述べたように、想定される治療的に有用なオリゴヌクレオチドには、天然に存在するスクレオチドで構成される天然のオリゴマーだけでなく、例えば安定性や脂質可溶性を改善し、それによって細胞の取り込みを強化した修饰スクレオチドを含むオリゴマーもまた含まれる。例えば、脂質可溶性強化および/または核酸分解酵素(スクレアーゼ)耐性の強化は、スクレオチド内のホスホジエステル結合内のホスフェート酸基をメチル基または硫黄原子で置換することによってもたらされることが知られている。ホスホチオエート(ホスフェート酸基が硫黄原子で置換されている"S-オリゴヌクレオチド")は、スクレアーゼ切断に対して安定で、脂

と相補的なオリゴヌクレオチドを用いるのが翻訳抑制に有利である。さらに、翻訳開始部位から3'方向にあまりにも離れた配列は、リボソームの潜在的"リードスルー"(メッセージの翻訳を可能にするためにアンチセンス/センス二重体(デュプレックス)を解きほぐすためにリボソームが必要とする現象)のために、mRNA転写物とのハイブリダイゼーションの効果が低い。

MT1およびMT2転写物に対する代表的なアンチセンス配列は、配列番号5(MT1)および配列番号6(MT2)で示される。このアンチセンス配列は、MT1またはMT2マーカー蛋白のいずれかのN-末端をコードする配列の他に、開始コドンの直ぐ上流の5'非翻訳配列にも相補的である(これらの配列の詳細な説明については上記の1. B節を参照のこと)。当業者には理解されるところであるが、MT1および/またはMT2転写物の他の領域と相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、配列番号1および3に示された配列を誘型として用いて容易に作製できる。

上記の1. B節で述べたように、いずれの長さのオリゴヌクレオチドもmRNA転写物とハイブリダイズさせるために利用できる。しかしながら、非常に短い配列(例えば8-15ヌクレオチド未満)の結合は特異性が低いかもしれない。その上、インビボでの使用では、そのような短い配列は酵素による分解に特に敏感であろう。さらに、オリゴヌクレオチドを細胞に直接与える場合は、非常に長い配列は、標的細胞による取り込みが減少するので抑制効果は低いであろう。したがって、オリゴヌクレオチドを直接標的細胞に与える場合は、8-50ヌクレ

質に可溶性で、特にオリゴヌクレオチドの直接投与のために好ましい。S-オリゴヌクレオチドは、上記の1. B節で述べた既知の自動化合成装置で化学的に合成できる。

mRNA翻訳抑制に適したオリゴヌクレオチド配列は、本明細書に記載され、さらに当技術分野でよく特性が調べられた標準的な方法を用いた標準的なインビトロアッセイで容易に評価される。プロトコルの実施例は下記で述べるが、他のプロトコルも想定され有利に用いられるであろう。

アンチセンスの候補配列は、標準的な化学的技術を用いて本明細書で提供するように調製される。例えば、配列番号5の285-315位に示す配列を有するMT1-アンチセンス配列は、アプライドバイオシステム社の自動DNA合成装置を用いて調製され、オリゴヌクレオチドは製造元の指示にしたがって精製できる。続いて、オリゴヌクレオチドを適切な悪性細胞株(例えばME-180)の培養に標準的な培養条件下で提供し、増殖細胞に取り込ませる。

好ましくは、ある範囲の投与量を用いて、ハイブリダイゼーション特異性と同等抑制のための効果的濃度を決定する。例えば、0-1000μgオリゴヌクレオチド/mlの投与範囲を調べることができる。さらに、オリゴヌクレオチドはただ1回のDNA感染(トランスフェクション)で細胞に与えることができるが、また連続的なトランスフェクションの部分として与えることもできる。

アンチセンス効果は、トランスフェクション後の時間の経過にしたがって細胞増殖における変化を、標準的な細胞計測方法および/またはマーカー蛋白の発現減少を、例えば上記の1.

Aで述べたように免疫蛍光によって分析して求めることができる。また別に、細胞の取り込み能およびチミジン利用能は、細胞分裂の分析のもう一つの標準的手段で、ここでも例えば³Hチミジンをを用いて実施することができる。効果的なアンチセンス抑制は、細胞分裂を十分に抑制して、チミジンの取り込みを減少させ、細胞増殖を抑制し、および/または検出可能なレベルのマーカー蛋白を減少させるはずである。

有用な濃度範囲は、新生物の性質と程度、用いられる特定のオリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチドに対する新生物の相対的感受性および他の因子にしたがって変動すると想定される。与えられた細胞の型にとって有用な範囲とオリゴヌクレオチドは、標準的な投与範囲実験を本明細書で述べるように実施して決定することができる。投与範囲実験はまた、正常および悪性細胞に対する毒性レベルを調べるために実施できる。10⁶細胞につき約1から100 μg/mlの濃度を用いるのが有利である。

インビボの使用では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、医薬担体（例えば適切な液体賦形剤）および場合によって補助添加剤と組み合わせてもよい。液体賦形剤は慣用的で市販物を手でできる。それらの例は、蒸留水、生理的食塩水、みどり糖水溶液などである。インビボの治療のために、アンチセンス配列は好ましくは直接悪性細胞に、例えば新生物部位に注射によって与えられる。また別に、アンチセンス配列が標的の悪性細胞に当該配列を誘導する手段を伴うことを条件として、オリゴヌクレオチドを全身投与することができる。

慣用的な担体とともに投与する外、アンチセンスオリゴヌク

リガンドで結合させることによって、悪性細胞に与えることができる。特定の細胞および細胞型に分子を的中させる手段は、化学療法分野ではよく記載されている。

結合蛋白は1. Aの節で述べたように得られ、テストすることができる。例えば、抗体の結合部分を有利に用いることができる。特に有用なものは、標的蛋白に対して高い親和性、例えば約10⁻⁶Mより大きい親和性で識別される結合蛋白である。また別に結合蛋白をコードするDNAを、当技術分野でよく記載されている遺伝子治療プロトコルに用いる操作の後、細胞内で発現されるべき発現可能な遺伝子の一部分として標的細胞に与えることができる（例えば米国特許第4497796号および“遺伝子転移”(Gene Transfer, Vijay R. Balchwal編、(1986))を参照）。INM蛋白複合体はそれによって細胞分裂を障害し抑制することができるものと期待される。

アンチセンスヌクレオチドについて上記で述べたように、インビトロの使用のためには、適切な結合蛋白は、適切な医薬担体（例えば生理的食塩水または医療分野でよく特性が知られた他の担体）と組み合わせることができる。医薬組成物は悪性細胞に直接、例えば直接注射することによって与えることができるが、また該結合蛋白が標的細胞に該蛋白を的中させる手段を伴うことを条件として全身的に投与することもできる。最後に適切な投与範囲および細胞毒性レベルは、標準的な投与量範囲実験を用いて調べることができる。治療的に有効な濃度は、0.1-1000 mg/日の範囲であろう。上記で述べたように、実際の投与量は、例えば悪性疾患の性質、患者の年齢、体重および健康度の外、他の因子によっても変動するであろう。

レオチドは、種々の特殊なオリゴヌクレオチド送達技術によって投与することができる。例えば、オリゴヌクレオチドは、文献に記載されているようにリボゾームで被包することができる [Maniatisら、; Manninoら、(1988) BioTechnology, 5:682; Felchnerら、(1989) Bethesda Res. Lab. Focus, 11:21]。再構築ウイルス外膜（エンベロープ）もまた用いられ、RNAおよびDNAを細胞に送達させることができた [例えば、Aradら、(1986) Biochem. Biophys. Acta., 859:88-94参照]。

インビボでの治療的使用では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、治療的に有効な量、例えば悪性細胞での標的蛋白発現を抑制するために十分な量で与えられる。投与される実際の投与量は、治療の性質が予防的か治療的か、患者の年齢、体重、健康度および性別、投与ルート、悪性疾患の大きさと性質の他、他の因子を考慮することができる。毎日の投与量は、1日当たり約0.01から1000 mgの範囲が可能である。それより多いまたは少ないオリゴヌクレオチド量も所望に応じて投与できる。医療分野、特に化学療法分野の業者には理解されるように、インビボ投与のための適切な投与範囲は、臨床家にとってはルーチンな検査であろう。予備的なガイドラインとして、上記のように、標的分子のインビトロ抑制に有効な濃度をまず求めることができる。

11. B蛋白抑制

別の実施例では、癌マーカー蛋白自体を標的分子として用いることができる。例えば、本質的に不可逆的にマーカー蛋白と結合するようにデザインされた結合蛋白を、例えば細胞に対して特異的で、かつ細胞によって吸収されることが分かっている

11. 実施例

以下の実施例は、さらに異常細胞型に対するマーカーとしてのMT1およびMT2の使用を説明し、さらに、MT1およびMT2蛋白をコードする遺伝子配列の分離の仕方および性状決定の方法を、範囲を限定することなく、そのクローニングと性状決定の最良の態様を合わせて説明する。例えば、大腸癌でのINM蛋白発現を本明細書で開示する。しかしながら、他の原核細胞および真核細胞発現系もまた、ここで開示する蛋白の組換え体発現のために想定される。包含される他の有用な宿主には、酵母菌属、昆虫/バキュロウイルス発現系、哺乳類細胞（例えば異種ミエロマ細胞および性状がよく調べられているチャイニーズハムスター卵巣細胞株）が含まれる。

MT1

下記に示すように、MT1発現レベルは、乳房、結腸、膀胱、卵巣、前立腺および子宮頸部の悪性細胞型を含む多数の異なる悪性細胞型において顕著に強化される。下記に示したものは標準的な免疫アッセイ（精度±5%）の結果であるが、正常および悪性ヒト組織抽出物（これはPCT公開公報に記載されたように8Mウレア、2%β-メルカプトエタノール、2%ノニデットP-40（洗剤）で調製された）について、本明細書およびPCT公開公報W093/03497号に記載されたように実施した。302.47抗体は、CaSk1 [子宮頸癌培養細胞株 (American Type Culture Collection), ATCC, ロックビル、メリーランド] 由来NM調製物に対して作製された。MT1:2-BはクローニングMT1蛋白に対して作製された。両抗体とも標準結合アッセイを用いて明らかにされたように、配列番号1によ

ってコードされた蛋白上のエピトープと結合する。下記に提示した結果から分かるように、MT1は悪性膀胱組織で顕著に上昇する。プロット実験はまた、MT1レベルが他の悪性組織で上昇することを示している。

表1

サンプル	抗体組み合わせ	ng MT1 / g 組織
正常膀胱	302.47/MT1:2-8	13500
膀胱癌	302.47/MT1:2-8	32000

クローニング

まず天然由来MT1蛋白を、本質的に米国特許第4882268号および4885236号に記載されたベンマンおよびフェイの方法にしたがって、ヒト子宮頸癌から分離した。ヒト子宮頸癌細胞株Ca SkiおよびME180 [ATCC (ロックビル、メリーランド) から入手] 由来細胞を細胞が接触し合うまで増殖させ、トリプシン処理によってフラスコから取り出した。懸濁細胞を細胞培養食塩水 (PBS) で2度洗浄し、細胞骨格緩衝液 (CSK: 100 mM NaCl, 300 mM 蔗糖, 10 mM PIPES, 3 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 0.5% トリトン-X100, 1.2 mM PMSF) で4℃1分抽出し、続いて冷RSB (細胞細胞懸濁緩衝液) / 2倍洗剤緩衝液 (100 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM トリス (pH 7.4), 1% トウイン40, 0.5% デオキシコレート, 1.2 mM PMSF) で抽出した。また別に、細胞をRSB / 2倍洗剤緩衝液で2度抽出した。2種の抽出プロトコルによって、極めて類似の調製物が得られた。抽出細胞を30分室温で消化緩衝液 (50 mM NaCl, 300 mM 蔗糖, 0.5% トリトン-X

100, 10 mM PIPES (pH 6.8), 3 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1.2 mM PMSF (100 μg のRNアーゼおよびDNアーゼIを含む)) で消化した。2 M の硫酸アンモニウムを0.25 M の最終濃度になるように加え、消化液からクロマチンを抽出した。抽出液マトリックス-中間フィラメント (NM-IF) 構成物を続いて3700×gで15分沈降させた。

得られたペレットを続いて分散緩衝液 (8 M グレア, 20 mM MES (pH 6.6), 1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 0.1 mM MgCl₂, 1% 2-メルカプトエタノール) に再懸濁し、ペレットを超音波処理し、さらに、2000容のフッセンブリー緩衝液 (0.15 M KCl, 25 mM イミダゾール (pH 7.1), 5 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 0.125 mM EGTA, 0.2 mM PMSF) を3回交換して一晩透析した。透析物を続いて100000×g 1時間遠心し、NM蛋白を上清から回収した。また別にNM-IF構成物を直接E400緩衝液 (0.4 M NaCl, 0.02 M トリス pH 7.5, 0.1 mM のMgCl₂, 0.5% 2-メルカプトエタノール, 1.2 mM PMSF) で4℃30分、フンクリスらの記載 (von Kriesら, (1991) Cell, 64:123-135) のように抽出した。続いてベックマン70.1 T1ローターで40000 rpm, 90分遠心した後、中間体フィラメントに富むペレットを除去した。残存上清は、殆どサイトケラチン夾雑物を含まずMT1蛋白に富む。

MT1特異抗体は標準的方法で作製した。特に、Balb/c x Jマウス (ジャクソンラボラトリー、バーバー、メー

ーを使って実施した。内部配列は合成プライマー (固定した配列に基づいて作製) を使って得た。

MT1の完全なスクレオチド配列および予想アミノ酸配列は配列番号1に示す。cDNAクローンはポリアデニル化シグナル (仮定的開始コドン)、連続した開放読み取り枠およびヒト遺伝子に合致するコドン利用を有している。MT1の予想アミノ酸配列は、pIが5.47の70.5 kDの蛋白をコードする639個のアミノ酸から成っている。一次構造は、チョウファスマンアルゴリズム (Chou-Fasman, (1978) Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 47:145-148) から予想されたように、72% アルファヘリックスから成り、その56% は延長ヘリックスである。

MT1の一次構造 (図1に提示) は27個のプロリン残基を含み、これは一般に分子全体に2個ずつまたは3個ずつとなって出現する。配列内のプロリン分布は図1Aに示すが、ここでダイヤはプロリン残基を表している。プロリンペアーおよびプロリントリプレットは積み重ねたダイヤで示されている。N-末端では40個のアミノ酸のストレッチは8個のプロリンの塊 (残基42-81) を含み、これは3個またはそれより少ないアミノ酸で分断されながら対になって出現する。同様なプロリンに富む領域がMT1のC-末端 (残基551-563) に出現し、ここでは13個のアミノ酸のストレッチ内に6個のプロリンが出現する。プロリンに富む両領域は、エミニーら (Eminiら, (1985) J. Virol., 55:836-839) の技術で決定したプロバビリティー計算によればおそらく蛋白表面に存在する。この高プロリン密度はまた、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳

に精製Ca Ski NM蛋白を2週間毎に16週間腹腔内に注射した。マウスには殺処分と脾臓摘出の4日前にただ1回追加免疫を注射した。フロイントの完全アジュバントは最初の注射で用い、二回目の注射では不完全フロイントアジュバントを、その後の注射は食塩水で実施した。脾臓細胞はSP2/O-A814マウスミエローマ株 (ATCC、ロックビル、メリーランド) とともに、当技術分野で周知の標準的融合方法を用いて融合させた。該マトリックス蛋白と反応する抗体を産生しているハイブリドーマをクローニングし、腹水として増殖させた。抗原特異性を免疫蛍光分光計およびウェスタンブロットアッセイで調べた。302.47抗体を用いて下記のように免疫ライブラリーをスクリーニングしMT1遺伝子を分離した。

MT1のcDNAクローンをラムダZAP免疫ライブラリー (ストラタジーン社、ラホイヤ、カリフォルニア) から得た。ライブラリースクリーニングは、MT1特異抗体302.47を用い製造元の指示にしたがって実施した。簡単に記せば、2.45 kb の挿入物を含むただ1個の陽性クローンを同定し、EcoRIおよびXhoIクローニング部位で開環したpBluescriptベクター (ストラタジーン、ラホイヤ、カリフォルニア) でサブクローニングした。得られたプラスミド (pMT1) の配列を直接調べ、さらにサブクローニングしてMT1融合蛋白を製造した (下記参照)。

cDNA配列は当技術分野で記載されている標準的なジデオキシ法を用いて得られた。二重鎖配列決定は、製造元 (ストラタジーン、ラホイヤ、カリフォルニア) の指示にしたがって、適切なプライマーを用いてプライミングしたpMT1ベクタ

動で求めたように異常な見かけの分子量を説明できるであろう。上記で述べたように、アミノ酸配列から想定したMT1の予想分子量は70.1 kDである。しかしながら、下記に述べるように、天然由来および組換え体蛋白はSDSポリアクリルアミドゲルで90 kD蛋白として移動する。別の選択肢として、この分子量の変動は、原核細胞および真核細胞の両方で達成できる翻訳後修飾の結果とも考えられる。

2つのプロリン富裕末端の間で、MT1は延長アルファヘリックス構造の領域に一致する配列を有するが、これは図1Bの斜線構造で示す。延長ヘリックスは、通常1対のプロリン残基を含む短いヘリックス-歪曲アミノ酸ストレッチによって4か所で遮られている。これらの理論上の計算に基づくMT1構造に関する予備的仮説は、この分子は、球状のプロリン富裕ドメインがいずれかの末端に境界を作っている伸長杆状体から成るということである。

利用可能な配列データベースの全ての分析によって、MT1は、いずれの既知蛋白とも顕著な相同性をもたない新規な配列を有することが示された。さらに、この配列は、いずれの既知の識別可能なDNA結合モチーフ（例えばロイシンジッパーモチーフ）も持たないと思われる。

クローン化MT1 DNAを使って、ME細胞由来の全RNAおよびポリA含有RNAのノーザンブロット分析を、15 μgのRNAで標準的な方法を用いて実施した。ブロットを実施し、³²P標識pMT1 DNAでハイブリダイズさせた後、ただ1本のmRNAのバンドがポリA含有分画で検出された。このバンドはオートラジオグラムの48時間露出では全RNA分画にお

いては検出されなかったが、これはMT1メッセージは少量のRNA種であることを示している。ノーザンブロット分析は、MT1蛋白は単一のmRNAから翻訳されることを示唆している。ノーザンブロット分析はまた、MT1 RNAは、配列番号1に示す蛋白コード配列の5'側約500 bpを含むことを示している。この上流の配列は1つまたはそれ以上の非翻訳配列を示しているかもしれないし、および/または付加的な蛋白コード配列をコードしているかもしれない。

MT1の融合蛋白は、上記のpMT1構築物からの挿入物を用いて、配列番号1およびpMAL発現系（ニューイングランドバイオラブ社、ビバリー、マサチューセッツ）で得られた。この系では、問題の遺伝子（MT1）はpMAL-cベクター（ニューイングランドバイオラブ社、ビバリー、マサチューセッツ）でクローニングし、ベクターを大腸菌にトランスフェクトし発現させて、問題の蛋白とマルトース結合蛋白の両方を含む融合蛋白を生成した。マルトース結合蛋白は、マルトースの存在化で融合蛋白を選択的に精製することを可能にし、さらに、その後でXa因子による蛋白分解切断で切断し、完全な組換え体MT1蛋白を得ることができる。ここでは、マルトース結合蛋白の5'末端に開始AUGコドンが直接連続するように、MT1 cDNAをpMAL-cベクターでクローニングした。Xa因子で蛋白分解による切断後、生成MT1融合蛋白は、一切の付加的アミノ酸をもたない、MT1 cDNAでコードされた完全なアミノ酸配列を保持している。pMAL系の実験は細胞に到るまで全て製造元の指示にしたがって実施された。

上記に述べたように、天然由来蛋白および組換え体生成蛋白

は、SDS-PAGEで約90 kDの見かけの分子量と一致する電気泳動移動度をもつ。さらに、両蛋白のpIは等しく(5.4)、アミノ酸配列から算定される予想pIと一致する。レットとマルチェシーの方法(Leto & Marchesi (1984) J. Biol. Chem. 259:4603-4049)にしたがって、システイン残基を2-ニトロ-5-チオシアノ安息香酸(MTCB)で切断した両蛋白のペプチドマッピングでは、ウェスタンブロット分析で同じMT1交差反応性を共有する同等なペプチドフラグメントが得られた。その上、生成したペプチドフラグメントの数と大きさは提唱されたMT1アミノ酸配列から予想されたものと一致している。

MT2

MT1と同様に、MT2発現レベルは、血清分析および組織培養上清分析の両方によって決定されたように、種々の悪性細胞型で顕著に増強される。下記に述べるアッセーでは、使用抗体は2種の異なる子宮頸癌細胞株(ME-180およびCaSk1、ATCC、ロックビル、メリーランド)のNM調製物に対して作製された。1000シリーズの抗体はME-180に対して作製されたもので、3000シリーズの抗体はCaSk1-NM免疫原に対して作製されたものである。下記の抗体のうち、107.7および307.33がMT2蛋白と特異的に結合し、さらに302-18、302-22および302-29がMT2と密接に関連し、それと一緒に分離される蛋白と交差反応することが分かった。

2種の抗体組み合わせのドーズ・レスポンス評価の結果は以下の表11に示すが、ME-180細胞培養上清が抗原として用いられている。各アッセーは、組織培養上清における抗原の

用量依存検出を示し、このアッセーが、死細胞から遊離される可溶性内部マトリックス蛋白を定量できることを明らかにしている。

表 11

抗体107-7固相、302-29可溶性抗体、ME-180上清

上清濃度	平均OD	SD
2:1	0.501	0.013
未希釈	0.274	0.018
1:2	0.127	0.006
1:4	0.067	0.006
1:8	0.035	0.009
1:16	0.021	0.007
上清なし	0.000	

抗体107-7固相、307-33可溶性抗体、ME-180上清

上清濃度	平均OD	SD
3:1	0.906	0.009
3:2	0.456	0.011
3:4	0.216	0.007
3:8	0.099	0.005
3:16	0.052	0.002
3:32	0.031	0.005
上清なし		

次に、内部マトリックス蛋白定量実験を種々の癌死腫瘍組織の上清で調べた。ここでは、血清を枯渇させて腫瘍と正常組織を培養液中で殺した。特に、細胞株は標準的な培養技術で組織培養フラスコで互いに接触するまで増殖させた。続いて培養液を血清非含有培養液と交換し、さらに細胞を5%CO₂の37℃保温器に7から14日間入れた。保温終了時に培養液を採集し、14000×gで遠心して細胞残層を取り除いた。上清

を種々の構成のサンドイッチアッセーで調べた。

結果を図3に示すが、ここでは、ME-180抗原を標準として用い、全ての値は単位/gである。図3から分かるように、MT2抗原は壊死組織の各々から遊離され、腫瘍組織での死細胞の増加は、癌組織対正常組織として定量したとき、より高いMT2平均抗原値として反映される。

図4は、癌患者と正常血液供与者からの血清サンプルを用いて実施した類似の実験結果を示す。ここでは組織は以下のように固定される。供与者から組織を取り出し、摘出後1.0分から4時間以内に液体窒素中でフラッシュ凍結を行い、必要なときまで-70℃で保存する。使用の準備ができた後、組織が溶けると、屠流フード内で無菌的に組織を0.1から0.3cm角に細切れにし、ファンギゾンとゲンタマイシンを含む血清非含有培養液を有するフラスコに入れた。一般に、2-4gの組織をT150フラスコ中の100mlの培養液に用いる。組織を含むフラスコを続いて4-7日間5%CO₂で37℃で保温する。保温後、培養液をフラスコから採集し、14000×gで20分遠心する。図3については、ME-180細胞抗原が標準である。結果は単位/mlで示す。血清抗原を血清で希釈し、続いて溶液中で蛋白を定量するコントロール実験では、血清は殆どまたは全くアッセーに影響を与えない。図4に示した結果から分かるように（図3で示した結果と同じように）、癌患者の血清サンプルは、正常血液の血清サンプルで検出されたものと比べて、癌患者の血清サンプルで検出される計量可能なより高レベルのMT2抗原によって示唆されるように、より高い細胞死の速度を反映している。

のではなく、発明の範囲は、前述の記載によるよりむしろ添付の請求の範囲によって示され、請求の範囲と同等の意味および範囲内に入る変更は本発明に包含される。

クローニング

MT1と同じ一般的な方法にしたがって、選択的にMT2に富む組成物をME-180細胞（子宮頸癌細胞、ATCC、ロックビル、メリーランド）から得、MT2特異的抗体を調製した。107.7抗体を用いて、MT1のようにラムダZAP発現ライブラリーをスクリーニングすることによってMT2の部分的cDNAクローンを得た。回収した部分的クローンを続いてpBlue-script IIベクター（pMT2）でサブクローニングし、標準的技術を用いてMT2cDNAの配列を調べた。配列番号3の残基1366から2865に対応する、配列を調べたDNAを続いて、読みとり枠およびコードされるアミノ酸配列を決定するために分析した。完全なコード配列はその後決定したが、配列番号3に示す（Comptonら、(1992) J. Cell Biol. 116:1395-1408）。MT2のヌクレオチド配列および予想アミノ酸配列は配列番号3に記載する。

MT2の一次構造は模式的に図2に示す。この蛋白は、プロリン対によって分断される少なくとも6個の螺旋領域を含むように思われる（図4AおよびB参照）。この一次構造は、蛋白が溶液中でコイルドコイル構造を形成することを可能にする。図3に関しては、プロリンはダイヤで、ヘリックスは斜線入り枠で示される。さらに、MT2のCおよびN末端の両方は球状ドメインのように折れ曲がるようである（Comptonら、(1992) J. Cell Biol. 116:1395-1408）。

本発明は、その神髄または本質的な特徴から外れることなく他の特異的な形態で具体化できる。ここに示した実施例は、したがって全ての局面において解説的なものであり、制限的な

配列リスト

(1) 一般情報:

(i) 出願人:

- (A) 氏名: Matritech, Inc.
- (B) 街: 7630 Concord Ave
- (C) 市: Cambridge
- (D) 州: マサチューセッツ
- (E) 国: アメリカ合衆国
- (F) 郵便コード (ZIP): 02138
- (G) 電話: 1-617-661-6660
- (H) ファックス: 1-617-661-8522
- (I) テレックス:

(ii) 発明の名称:

断続的な悪性細胞型内部核マトリックスマーカー

(iii) 配列の総数: 6

(iv) 郵便物の宛先:

- (A) 名宛人: TESTA HURWITZ & TRIBEAULT
- (B) 街: 53 STATE STREET
- (C) 市: ボストン
- (D) 州: マサチューセッツ
- (E) 国: アメリカ合衆国
- (F) ZIP: 02109

(v) コンピューター解釈形式:

- (A) 媒体型: フロッピーディスク
- (B) コンピューター: IBM PCコンパチブル
- (C) 演算システム: PC-DOS/MS-DOS
- (D) ソフト: Patent In Release #1.0, バージョン #1.25

(vi) 現在の出願状況:

- (A) 出願番号: US
- (B) 出願日:
- (C) 分類:

(vii) 代理人情報:

- (A) 氏名: PITCHER ESQ, EDMUND R
- (B) 登録番号: 27829
- (C) リファレンス/ドケット番号: MTP-013

(ix) 通信に関する情報:

- (A) 電話: 617/248-7000
- (B) ファックス: 617/248-7100

(2) 配列番号1の情報は:

(i) 配列の性状:

(A) 長さ: 2360塩基対

(B) 型: 紡錘

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直線状

(ii) 分子の型: cDNA

(v) 由来:

(A) 生物種: ホモサピエンス

(F) 組織型: 子宮頸部腫瘍

GAGATGCTTC TTGCTCTCC ACCTTAATA GTTCCATTGC CAAAGAAATC GATTCAGTGC 60

GGTCCACTAA AAATCTCTAG TGTATCAGAA GTA ATG AAA GAA TTT AAA CAG CTT
Met Lys Glu Ser Lys Gln Pro
1 5GCC TCA CAA CTC CAA AAA CAA AAG GGA GAT ACT CCA GCT TCA GCA ACA
Ala Ser Gln Leu Gln Lys Gln Lys Gly Asp Thr Pro Ala Ser Ala Thr
10 15 20GCA CCT ACA GAA GCG GCT CAA ATT ATT TCT GCA GCA GGT GAT ACC CTG
Ala Pro Thr Glu Ala Ala Gln Ile Ile Ser Ala Ala Gly Asp Thr Leu
25 30 35TCG GTC CCA GCC CCT GCA GTT CAG CCT GAG GAA TCT TTA AAA ACT GAT
Ser Val Pro Ala Pro Ala Val Gln Pro Glu Glu Ser Leu Lys Thr Asp
40 45 50 55CAC CCT GAA ATT GGT GAA GGA AAA CCC ACA CCT GCA CTT TCA GAA GCA
His Pro Gln Ile Gly Glu Gly Lys Pro Thr Pro Ala Leu Ser Glu Ala
60 65 70TCC TCA TCT TCT ATA AGG GAG CGA CCA CCT GAA GAA GTT GCA GCT CGC
Ser Ser Ser Ser Ile Arg Glu Arg Pro Pro Glu Glu Val Ala Ala Arg
75 80 85CTT GCA CAA CAG GAA AAA CAA GAA CAA GTT AAA ATT CAG TCT CTA GCC
Leu Ala Gln Gln Glu Lys Gln Gln Glu Val Lys Ile Glu Ser Leu Ala
90 95 100AAG AGC TTA GAA GAT GCT CTG AGC CAA ACT GCA AGT GTC ACT CTG CAG
Lys Ser Leu Glu Asp Ala Leu Arg Gln Thr Ala Ser Val Thr Leu Gln
105 110 115GCT ATT GCA GGT CAG AAT GGT GCG GTC CAG GCT CTC AAT GCA CAC TCC
Ala Ile Ala Ala Gln Asn Ala Ala Val Gln Ala Val Asn Ala His Ser
120 125 130 135GCT GAA CAG CAC ACA AAG ATA GAA GAA GTC AGA GAT GCC ATG GAA AAT
Ala Glu Gln Asp Arg Lys Ile Glu Glu Val Arg Asp Ala Met Glu Asn
345 350 355CAA ATC AGA ACC CCT TCG CCG ACA GCA GCT GCC CAC ACT GAT CAC TTG
Glu Met Arg Thr Pro Ser Pro Thr Ala Ala Ala His Thr Asp His Leu
360 365 370 375CGA GAT GTC CTT AGC GTA CAA GAA CAG GAA TTG AAG TCT GAA TTT GAG
Arg Asp Val Leu Arg Val Gln Gln Gln Glu Leu Lys Ser Glu Phe Glu
380 385 390CAG AAC CTG TCT GAG AAA CTC TCT GAA CAA GAA TTA CAA TTT CGT CGT
Gln Asn Leu Ser Ser Glu Lys Leu Ser Glu Gln Glu Leu Gln Phe Arg Arg
395 400 405CTC AGT CAA GAG CAA GTT GAC AAC TTT ACT CTG GAT ATA AAT ACT GCC
Leu Ser Gln Glu Gln Val Asp Asn Phe Thr Leu Asp Ile Asn Thr Ala
410 415 420TAT GCC AGA CTC AGA GGA ATC GAA CAG GCT GTT CAG AGC CAT GCA GTT
Tyr Ala Arg Leu Arg Gly Ile Glu Gln Ala Val Gln Ser His Ala Val
425 430 435GCT GAA GAG GAA GCC AGA AAA GCC CAC CAA CTC TGG CTT TCA GTG GAG
Ala Glu Glu Glu Ala Arg Lys Ala His Gln Leu Trp Leu Ser Val Glu
440 445 450 455GCA TTA AAG TAC AGC ATG AAG ACC TCA TCT GCA GAA ACA CTT ACT ATC
Ala Leu Lys Tyr Ser Met Lys Thr Ser Ser Ala Glu Thr Pro Thr Ile
460 465 470CCG CTG GGT ACT GCG GTT GAG GCC ATC AAA GCC AAC TGT TCT GAT AAT
Pro Leu Gly Ser Ala Val Glu Ala Ile Lys Ala Asn Cys Ser Asp Asn
475 480 485GAA TTC ACC CAA GCT TTA ACC GCA GCT ATC CTT CCA GAG TCC CTG ACC
Glu Phe Thr Gln Ala Leu Thr Ala Ala Ile Pro Pro Glu Ser Leu Thr
490 495 500CGT GCG GTC TAC AGT GAA GAG ACC CTT AGA GCC GGT TTC TAT CTT GTT
Arg Gly Val Tyr Ser Glu Glu Thr Leu Arg Ala Arg Phe Tyr Ala Val
505 510 515CAA AAA CTG GCC CCA AGC GTA CCA ATG ATT GAT GAA ACC AGA AAT AGC
Gln Lys Leu Ala Arg Arg Val Ala Met Ile Asp Glu Thr Arg Asn Ser
520 525 530 535TTG TAC CAG TAC TTC CTC TCC TAC CTA CAG TCC CTG CTC CTA TTC CCA
Leu Tyr Gln Tyr Phe Leu Ser Tyr Leu Gln Ser Leu Leu Phe Pro
540 545 550AAC ATA TTG AAA GCC GCC ATG GAC AAT TCT CAG ATT GCA GCG GAG AAG 546
Asn Ile Leu Lys Ala Ala Met Asp Asn Ser Glu Ile Ala Gly Glu Lys
140 145 150AAA TCT GCT CAG TCG CGC ACA GTG GAG GGT CCA TTG AAG GAA CCG AGA 594
Lys Ser Ala Gln Trp Arg Thr Val Glu Gly Ala Leu Lys Ala Arg Arg
155 160 165AAG GCA GTA CAT GAA GCT GCC GAT GCC CTT CTC AAA GCC AAA GAA GAG 642
Lys Ala Val Asp Glu Ala Ala Asp Ala Leu Leu Lys Ala Lys Glu Glu
170 175 180TTA CAG AAG ATG AAA AGT GTG ATT GAA AAT GCA AAG AAA AAA GAG GTT 690
Leu Glu Lys Met Lys Ser Val Ile Glu Asn Ala Lys Lys Lys Glu Val
185 190 195GCT GCG GCC AAG CCT CAT ATA ACT GCT GCA GAG GGT AAA CTT CAC AAC 738
Ala Gly Ala Lys Pro His Ile Thr Ala Ala Glu Gly Lys Leu His Asn
200 205 210 215ATG ATA GTT CAT CTG CAT AAT GTG GTC AAA AAG GTC CAA GCA GCT CAG 786
Met Ile Val Asp Leu Asp Asn Val Val Lys Lys Val Gln Ala Ala Gln
220 225 230TCT GAG CCT AAG CTT GTA TCT CAG TAT CAT GAG CTG GTG GTC CAA GCT 834
Ser Glu Ala Lys Val Val Ser Gln Tyr His Glu Leu Val Val Glu Ala
235 240 245CGC GAT GAC TTT AAA CGA CAG CTG GAC AGT ATT ACT CCA GAA GTC CTT 882
Arg Asp Asp Phe Lys Arg Glu Leu Asp Ser Ile Thr Pro Glu Val Leu
250 255 260CCT GCG TCG AAA GCA ATG AGT GTT TCA GAC TTA GCT GAC AAG CTC TCT 930
Pro Gly Trp Lys Gly Met Ser Val Ser Asp Leu Ala Asp Lys Leu Ser
265 270 275ACT GAT GAT CTG AAC TCC CTC ATT GCT CAT GCA CAT CGT CGT ATT GAT 978
Thr Asp Asp Leu Asn Ser Leu Ile Ala His Ala His Arg Arg Ile Asp
280 285 290 295CAG CTG AAC AGA GAG CTG GCA GAA CAG AAG GCC ACC GAA AAG CAG CAC 1026
Gln Leu Asn Arg Glu Leu Ala Glu Gln Lys Ala Thr Glu Lys Gln His
300 305 310ATC ACG TTA GCC TTG CAG AAA CAA AAG CTG GAA GAA AAG CGC GCA TTT 1074
Ile Thr Leu Ala Leu Glu Lys Gln Lys Leu Glu Glu Lys Arg Ala Phe
315 320 325GAC TCT GCA GTA CCA AAA GCA TTA GAA CAT CAC AGA AGT GAA ATA CAG 1122
Asp Ser Ala Val Ala Lys Ala Leu Glu His His Arg Ser Glu Ile Gln
330 335 340CCT CAG CAA CTG AAG CCG CCC CCA GAG CTC TGC CCT GAG GAT ATA AAC 1794
Pro Gln Gln Leu Lys Pro Pro Pro Glu Leu Cys Pro Glu Asp Ile Asn
555 560 565ACA TTT AAA TTA CTG TCA TAT GCT TCC TAT TGC ATT GAG GAT GGT GAT 1842
Thr Phe Lys Leu Leu Ser Tyr Ala Ser Tyr Cys Ile Glu His Gly Asp
570 575 580CTG CAG CTA CCA CCA AAG TTT GTC AAT CAG CTG AAG GCG GAA TCC AGA 1890
Leu Glu Leu Ala Ala Lys Phe Val Asn Gln Leu Lys Gly Glu Ser Arg
585 590 595CGA GTC CCA CAG GAC TGG CTG AAG GAA GCC CGA ATG ACC CTA GAA ACC 1938
Arg Val Ala Gln Asp Trp Leu Lys Glu Ala Arg Met Thr Leu Glu Thr
600 605 610 615AAA CAG ATA GTG GAA ATC CTG ACA GCA TAT GCC ACC GCC GTA GCA ATA 1986
Lys Gln Ile Val Glu Ile Leu Thr Ala Tyr Ala Ser Ala Val Gly Ile
620 625 630GCA ACC ACT CAG GTG CAG CCA CAG TCAGCTTAC GAAGATTTC ATAAAGTCAT 2040
Gly Thr Thr Gln Val Gln Pro Glu
635

ATTTCATTC AAAGAAATC AGCACTGATA GATGAAGGT TCGACCGAC AGTCGCGAC 2100

TTGTATGAA ATGACGAGGT TTACAGTAC TGTGTAAAT GTTAACACCT GTTGCATTCA 2160

TATTCCTTC ATTTCATTC ATGTCACTGA AGCCGAGGAC TGTTCCTTT GCAACTTGTG 2220

TAACATTTC TGTTCCTTC GCTTTACTG ATGAGCGTTG TCAGGCCAAT CAAATAATG 2280

TTTGTGATC CTACTACTGT TGATTTCGC CTGCGAGCA ACTGAATAA GCAACAAGAT 2340

GAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 2360

(2) 配列番号2の情報は:

(i) 配列の性状:

(A) 長さ: 639アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直線状

(ii) 分子の型: 蛋白

(x i) 配列の記載: 配列番号2

Met Lys Glu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Leu Gln Lys Gln Lys Gly
1 5 10 15Asp Thr Pro Ala Ser Ala Thr Ala Pro Thr Glu Ala Ala Gln Ile Ile
20 25 30

Ser Ala Ala Gly Asp Thr Leu Ser Val Pro Ala Pro Ala Val Gln Pro
35 40 45
Glu Glu Ser Leu Lys Thr Asp His Pro Glu Ile Gly Glu Gly Lys Pro
50 55 60
Thr Pro Ala Leu Ser Glu Ala Ser Ser Ser Ser Ile Arg Glu Arg Pro
65 70 75 80
Pro Glu Glu Val Ala Ala Arg Leu Ala Gln Gln Glu Lys Gln Glu Gln
85 90 95
Val Lys Ile Glu Ser Leu Ala Lys Ser Leu Glu Asp Ala Leu Arg Gln
100 105 110
Thr Ala Ser Val Thr Leu Gln Ala Ile Ala Ala Gln Asn Ala Ala Val
115 120 125
Gln Ala Val Asn Ala His Ser Asn Ile Leu Lys Ala Ala Met Asp Asn
130 135 140
Ser Glu Ile Ala Gly Glu Lys Lys Ser Ala Gln Trp Arg Thr Val Glu
145 150 155 160
Gly Ala Leu Lys Glu Arg Arg Lys Ala Val Asp Glu Ala Ala Asp Ala
165 170 175
Leu Leu Lys Ala Lys Glu Glu Leu Glu Lys Met Lys Ser Val Ile Glu
180 185 190
Asn Ala Lys Lys Lys Glu Val Ala Gly Ala Lys Pro His Ile Thr Ala
195 200 205
Ala Glu Gly Lys Leu His Asn Met Ile Val Asp Leu Asp Asn Val Val
210 215 220
Lys Lys Val Gln Ala Ala Gln Ser Glu Ala Lys Val Val Ser Gln Tyr
225 230 235 240
His Glu Leu Val Val Gln Ala Arg Asp Asp Phe Lys Arg Glu Leu Asp
245 250 255
Ser Ile Thr Pro Glu Val Leu Pro Gly Trp Lys Gly Met Ser Val Ser
260 265 270
Asp Leu Ala Asp Lys Leu Ser Thr Asp Asp Leu Asn Ser Leu Ile Ala
275 280 285
His Ala His Arg Arg Ile Asp Glu Leu Asn Arg Glu Leu Ala Glu Gln
290 295 300

Lys Ala Thr Glu Lys Gln His Ile Thr Leu Ala Leu Glu Lys Gln Lys
305 310 315 320
Leu Glu Glu Lys Arg Ala Phe Asp Ser Ala Val Ala Lys Ala Leu Glu
325 330 335
His His Arg Ser Glu Ile Gln Ala Glu Gln Asp Arg Lys Ile Glu Glu
340 345 350
Val Arg Asp Ala Met Glu Asn Glu Met Arg Thr Pro Ser Pro Thr Ala
355 360 365
Ala Ala His Thr Asp His Leu Arg Asp Val Leu Arg Val Gln Glu Gln
370 375 380
Glu Leu Lys Ser Glu Phe Glu Gln Asn Leu Ser Glu Lys Leu Ser Glu
385 390 395 400
Gln Glu Leu Gln Phe Arg Arg Leu Ser Gln Glu Gln Val Asp Asn Phe
405 410 415
Thr Leu Asp Ile Asn Thr Ala Tyr Ala Arg Leu Arg Gly Ile Glu Gln
420 425 430
Ala Val Gln Ser His Ala Val Ala Glu Glu Glu Ala Arg Lys Ala His
435 440 445
Gln Leu Trp Leu Ser Val Glu Ala Leu Lys Tyr Ser Met Lys Thr Ser
450 455 460
Ser Ala Glu Thr Pro Thr Ile Pro Leu Gly Ser Ala Val Glu Ala Ile
465 470 475 480
Lys Ala Asn Cys Ser Asp Asn Glu Phe Thr Gln Ala Leu Thr Ala Ala
485 490 495
Ile Pro Pro Glu Ser Leu Thr Arg Gly Val Tyr Ser Glu Glu Thr Leu
500 505 510
Arg Ala Arg Phe Tyr Ala Val Gln Lys Leu Ala Arg Arg Val Ala Met
515 520 525
Ile Asp Glu Thr Arg Asn Ser Leu Tyr Gln Tyr Phe Leu Ser Tyr Leu
530 535 540
Gln Ser Leu Leu Leu Phe Pro Pro Gln Gln Leu Lys Pro Pro Pro Glu
545 550 555 560
Leu Cys Pro Glu Asp Ile Asn Thr Phe Lys Leu Leu Ser Tyr Ala Ser
565 570 575

Tyr Cys Ile Glu His Gly Asp Leu Glu Leu Ala Ala Lys Phe Val Asn
580 585 590
Gln Leu Lys Gly Glu Ser Arg Arg Val Ala Gln Asp Trp Leu Lys Glu
595 600 605
Ala Arg Met Thr Leu Glu Thr Lys Gln Ile Val Glu Ile Leu Thr Ala
610 615 620
Tyr Ala Ser Ala Val Gly Ile Gly Thr Thr Gln Val Gln Pro Glu
625 630 635

(2) 配列番号3の情報:

(i) 配列の性状:

- (A) 長さ: 6306塩基対
(B) 型: 核酸
(C) 鎖の数: 一本鎖
(D) トポロジー: 直線状

(ii) 分子の型: DNA

(ix) 特徴

- (A) 名称/キー: CDS
(B) 部位: 1..6306

(x) 文献情報:

- (A) 著者: Duane A. Compton; Ilya Szilak; Don W. Cleveland
(B) NLSMAの一次構造...
(C) 雑誌: Journal of Cell Biology
(D) 巻: 116
(E) 配列番号3の関連塩基: 1から5306
(F) ページ: 1395-1408
(G) 日付: 1992年3月

(xi) 配列の記載: 配列番号3

ATG ACA CTC CAC GGC ACC GCG GCG GCT GCA CTC CTC TCT TGG GTG AAC
1 5 10 15
ACT CTA CAC CTC GCT GAC CTT GTG GAG GCT GTG CAG CAC CTC CAG GAC
20 25 30
TGC ACC ATC TTC ATC AAG ATC ATT GAC AGA ATC CAT GGC ACT GAA GAG
35 40 45

GGA CAG CAA ATC CTC AAG CAG CCG GTG TCA CAG AGA CTG CAC TTT CTC
50 55 60
TGC AGT TTT CTC CAG AAA AAT CGA AAA CAT CCC TCT TCC CCA GAA TGC
65 70 75 80
CTG GTA TCT GCA CAG AAG GTG CTA CAG CGA TCA CAG CTC GAA CTG GCG
85 90 95
AAG ATC ACC ATC CTC CTC TTA TAC CAC TCT ACC ATC ACC TCC AAA AGT
100 105 110
CCC AGC GAC TGC GAA CAG TTT GAA TAT AAA ATT CAC GCT GAG TTG GCT
115 120 125
GTC ATT CTT AAA TTT CTC CTC GAC CAT CAG CAC GCG CTA AAC CTT AAT
130 135 140
CAG GAC CTA CAG AAC TTC CTA CAG AAA GCT CTT GTG CTT TCT ACC TGT
145 150 155 160
TCT ACC ACA TTC CTT GAA CAG CTC TCC CCA CTT AGC CAC CAG GCT AAG
165 170 175
AGC GAG ATT CCG TTC CTA CAG CTA CAG AAG GTT GCC TCC TCT TCC ACT
180 185 190
GGC AAC AAC TTT CTC TCA GGT TCT CTA GCT TCT CCC ATG GGT GAT ATC
195 200 205
CTG CAG ACC CCA CAG TTC CAG ATC AGA GCG CTG AAC AAG CAG CTT GAT
210 215 220
GAT GAG AGA ACT AAT ACC GAT GAG CTC GAG CTG CAG CTA GCT CAG AAC
225 230 235 240
CGC AAG CTC CTC ACC GAG AAG GAT GCA CAG ATA GCC ATG ATG CAG CAG
245 250 255

192

240

288

336

384

432

480

528

576

624

672

720

768

CGC ATT GAC GGC CTA GCC CTG CTG AAT GAC AAG CAG GGC GCC AGC CCA 816
Arg Ile Asp Arg Leu Ala Leu Leu Asn Glu Lys Gln Ala Ala Ser Pro
260 265 270

CTG GAG CCC AAG GAG CTT GAG CAG CTG CTT GAC AAG AAT GAG AGC CTT 864
Leu Glu Pro Lys Glu Leu Glu Glu Leu Arg Asp Lys Asn Glu Ser Leu
275 280 285

ACC ATG CCG CTG CAT GAA ACC CTG AAG CAG TGC CAG GAC CTG AAG ACA 912
Thr Met Arg Leu His Glu Thr Leu Lys Gln Cys Gln Asp Leu Lys Thr
290 295 300

GAG AAG AGC CAG ATG CAT GGC AAA ATC AAC CAG CTT TGC CAG CAG AAT 960
Glu Lys Ser Gln Met Asp Arg Lys Ile Asn Gln Leu Ser Glu Glu Asn
305 310 315 320

GCA GAC CTT TCC TTT AAG CTG CCG CAG TTT GCC AGT CAT CTG CAG CAG 1008
Gly Asp Leu Ser Phe Lys Leu Arg Glu Phe Ala Ser His Leu Gln Gln
325 330 335

CTA CAG GAT GCC CTC AAT GAG CTG ACC GAG CAG CAG AGC AAG GCC ACT 1056
Leu Glu Asp Ala Leu Asn Glu Leu Thr Glu Glu His Ser Lys Ala Thr
340 345 350

CAG GAG TGC CTA GAG AAG CAG GCC CAG CTG CAG AAG CAG CTC AGC GCA 1104
Gln Glu Trp Leu Glu Lys Gln Ala Gln Leu Glu Lys Glu Leu Ser Ala
355 360 365

GCC CTG CAG CAC AAG AAA TGC CTT GAA CAG AAG AAC GAA ATC CTT CAG 1152
Ala Leu Gln Asp Lys Lys Cys Leu Glu Glu Lys Asn Gln Ile Leu Gln
370 375 380

GGA AAA CTT TCA CAG CTG GAA GAA CAC TTG TCC CAG CTG CAG GAT AAC 1200
Gly Lys Leu Ser Gln Leu Glu Glu His Leu Ser Gln Leu Gln Asp Asn
385 390 395 400

CCA CCC CAG CAG AAG GGC CAG CTG CTG GGT GAT GTC TTG CAG CTG GAA 1248
Pro Pro Gln Glu Lys Gly Glu Val Leu Gly Asp Val Leu Gln Leu Gln
405 410 415

ACC TTG AAG CAA GAG GCA GCC ACT CTT GCT CCA AAC AAC ACA CAG CTC 1296
Thr Leu Lys Gln Glu Ala Ala Thr Leu Ala Ala Asn Asn Thr Gln Leu
420 425 430

CAA GCC AGC GTA CAG ATG CTG GAG ACT GAG CCA GGC CAG CAG GAA GCC 1344
Gln Ala Arg Val Glu Met Leu Glu Thr Glu Arg Gly Gln Gln Glu Ala
435 440 445

AAG CTG CTT GCT GAG CCG GGC CAC TTC GAA GAA AAG CAG CAG CTG 1392
Lys Leu Leu Ala Glu Arg Gly His Phe Glu Glu Glu Lys Gln Gln Leu
450 455 460

TCT AGC CTG ATC ACT GAC CTG CAG AGC TCC ATC TCC AAC CTC AGC CAG 1440
Ser Ser Leu Ile Thr Asp Leu Gln Ser Ser Ile Ser Asn Leu Ser Gln
465 470 475 480

GCC AAG GAA GAG CTG GAG CAG GCC TCC CAG GCT CAT GGC GCC CCG TTG 1488
Ala Lys Glu Glu Leu Glu Gln Ala Ser Gln Ala His Gly Ala Arg Leu
485 490 495

ACT GGC CAG GTG GCC TCT CTG ACC TCT GAG CTC ACC ACA CTC AAT GCC 1536
Thr Ala Gln Val Ala Ser Leu Thr Ser Glu Leu Thr Thr Asn Ala
500 505 510

ATC ATC CAG CAA CAG GAT CAA GAA CTG GCT GGC CTG AAG CAG CAG GCT 1584
Thr Ile Gln Gln Gln Asp Gln Glu Leu Ala Gly Leu Lys Gln Gln Ala
515 520 525

AAA GAG AAG CAG GCC CAG CTA GCA CAG ACC CTC CAA CAG CAA GAA CAG 1632
Lys Glu Lys Gln Ala Gln Leu Ala Gln Thr Leu Gln Gln Gln Gln
530 535 540

GCC TCC CAG GCC CTC GGC CAC CAG CTG CAG CAG CTA ACC AGT AGC CTG 1680
Ala Ser Gln Gly Leu Arg His Gln Val Glu Gln Leu Ser Ser Ser Leu
545 550 555 560

AAG CAG AAG GAG CAG CAG TTG AAG GAG CTA GGC CAG AAG CAG CAG CCA 1728
Lys Gln Lys Glu Gln Leu Lys Glu Val Ala Glu Lys Gln Gln Ala
565 570 575

ACT AGC CAG GAC CAT GCC CAG CAA CTG GCT ACT GCT CCA CAG CAG CCA 1776
Thr Arg Gln Asp His Ala Gln Gln Leu Ala Thr Ala Ala Glu Glu Arg
580 585 590

GAG GCT TCC TTA AGC GAG CCG GAT GCG GCT CTC AAG CAG CTG CAG CCA 1824
Glu Ala Ser Leu Arg Glu Arg Asp Ala Ala Leu Lys Gln Leu Glu Ala
595 600 605

CTG CAG AAG GAG AAG GCT GCC AAG CTS GAG ATT CTC CAG CAG CAA CTT 1872
Leu Glu Lys Glu Lys Ala Ala Lys Leu Glu Ile Leu Gln Gln Gln Leu
610 615 620

CAG GTG GCT AAT GAA GCC CCG GAC AGT GCC CAG ACC TCA CTC ACA CAG 1920
Gln Val Ala Asn Glu Ala Arg Asp Ser Ala Gln Thr Ser Val Thr Thr
625 630 635 640

GCC CAG CCG CAG AAG CCA GAG CTG ACC CCG AAG GTC GAG GAA CTC CAG 1968
Ala Gln Arg Glu Lys Ala Glu Leu Ser Arg Lys Val Glu Glu Leu Gln
645 650 655

GCC TCT CTT GAG ACA GCC CCG CAG GAA CAG CAT GAG GCT CAG GCT CAG 2016
Ala Cys Val Glu Thr Ala Arg Gln Gln Glu His Glu Ala Gln Ala Gln
660 665 670

CTT CCA CAG CTA CAG TTG CAG CTG CCG TCT GAG CAG CAA AAA CCA ACT 2064
Val Ala Glu Leu Glu Leu Gln Leu Arg Ser Glu Gln Gln Lys Ala Thr
675 680 685

CAG AAA GAA AGC GTC GGC CAG CAG AAG CAG CAG CTG CAG CAG CAG CTC 2112
Glu Lys Glu Arg Val Ala Gln Glu Lys Asp Gln Leu Gln Glu Gln Leu
690 695 700

CAG GCC CTC AAA GAG TCC TTG GAT ACC AAG GCC AGC CTT CAA GAG 2160
Gln Ala Leu Lys Glu Ser Leu Lys Val Thr Lys Gly Ser Leu Glu Glu
705 710 715 720

CAG AAG CCG AGC GCT CCA GAT CCG CTG GAA GAG CAG CAG CTT TGT ATC 2208
Glu Lys Arg Arg Ala Ala Asp Ala Leu Glu Glu Gln Gln Arg Cys Ile
725 730 735

TCT CAG CTG AAG CCA ACC CCA ACC CTG GTC GAG CAG CAT AAG CCG 2256
Ser Glu Lys Lys Ala Glu Thr Arg Ser Leu Val Glu Gln His Lys Arg
740 745 750

GAA CCA AAG GAG CTG GAA GAA GAG AGC GCT GCG GGC AAG GCG CTG GAG 2304
Glu Arg Lys Glu Leu Glu Glu Glu Arg Ala Gly Arg Lys Gly Leu Glu
755 760 765

GCT CCA TTA CTG CAG CTT GCG GAG GCT CAT GAG GCT GAG ACT GAA CTC 2352
Ala Arg Leu Leu Gln Leu Gly Glu Ala His Gln Ala Glu Thr Glu Val
770 775 780

CTG CCG CCG GAG CTG GCA GAG GCC ATG GCT GCC CAG CAG ACA GCT CAG 2400
Leu Arg Arg Glu Leu Ala Glu Ala Met Ala Ala Gln His Thr Ala Glu
785 790 795 800

ACT GAG TGT GAG CAG CTC GTC AAA GAA GTA GCT GCC TGC CTT CAG CCG 2448
Ser Glu Cys Glu Gln Leu Val Lys Glu Val Ala Ala Trp Arg Asp Gly
805 810 815

TAT GAG GAT AGC CAG CAA GAG CAG GCA CAG TAT GCT GCT ATG TTC CAG 2496
Tyr Glu Asp Ser Gln Gln Glu Glu Ala Gln Tyr Gly Ala Met Phe Gln
820 825 830

GAA CAG CTG ATG ACT TTG AAG CAG GAA TGT CAG AAG GCC CCG CAG CAG 2544
Glu Gln Leu Met Thr Leu Lys Glu Glu Cys Glu Lys Ala Arg Gln Glu
835 840 845

CTG CAG GAG CCA AAG CAG AAG GTC GCA GGC ATA GAA TCC CAG ACC CAG 2592
Leu Gln Glu Ala Lys Glu Lys Val Ala Gly Ile Gln Ser His Ser Glu
850 855 860

CTC CAG ATA ACC CCG CAG CAG AAC AAA CTA GCT CAG CTC CAT GCC AAC 2640
Leu Gln Ile Ser Arg Gln Gln Asn Lys Leu Ala Glu Leu His Ala Asn
865 870 875 880

CTG GCT AGA CCA CTC CAG CAG GTC CAA CAG AAG CAA CTC AGC CCG CAG 2688
Leu Ala Arg Ala Leu Gln Gln Val Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Gln
885 890 895

AAG CTT CCA GAT GAC CTC TCC ACT CTC CAG GAA AAG ATG GCT GCC ACC 2736
Lys Leu Ala Asp Asp Leu Ser Thr Leu Gln Glu Lys Met Ala Ala Thr
900 905 910

ACC AAA GAG CTG GCC GGC TTG CAG ACC TTG GTC CCG AAG CCA GCT CAG 2784
Ser Lys Glu Val Ala Arg Leu Glu Thr Leu Val Arg Lys Ala Gly Glu
915 920 925

CAG CAG GAA ACA GCC TCC CCG GAG TTA GTC AAG CAG CCT GCG AGC CCA 2832
Gln Gln Glu Thr Ala Ser Arg Glu Leu Val Lys Glu Pro Ala Arg Ala
930 935 940

GCA CAG ACA CAG CCC GAG TGG CTG GAA CAG CAA CAG CCA CCG CAG TTC 2880
Gly Asp Arg Gln Pro Glu Trp Leu Glu Glu Gln Gln Gly Arg Gln Phe
945 950 955 960

TGC ACC ACA CAG CCA GCG CTG CAG GCT ATG CAG CCG CAG CCA CAG CAG 2928
Cys Ser Thr Gln Ala Ala Leu Gln Ala Met Glu Arg Glu Ala Glu Gln
965 970 975

ATG GGC AAT GAG CTG GAA CCG CTG GCG GCT GCG CTG ATG CAG ACC CAG 2976
Met Gly Asn Glu Leu Glu Arg Leu Arg Ala Ala Leu Met Gln Ser Gln
980 985 990

GCG CAG CAG CAG CAG CAG CCG GCG CAG CAG GAA AGC CAG CTG GCG CCG 3024
Gly Gln Gln Gln Glu Glu Arg Gly Gln Gln Glu Arg Glu Val Ala Arg
995 1000 1005

CTG ACC CAG CAG CCG GCG GCT GCG CAG GCT CAG CTT GCG CTG CAG AAG 3072
Leu Thr Gln Glu Arg Gly Arg Ala Gln Ala Asp Leu Ala Leu Glu Lys
1010 1015 1020

GCT GCT AGA CCA GAG CTT GAG ATG CCG CTG CAG AAC GCT CTC AAC CAG 3120
Ala Ala Arg Ala Glu Leu Gln Met Arg Leu Gln Asn Ala Leu Asn Glu
1025 1030 1035 1040

CAG CTT GTC CAG TTC GCT ACC CTG CAA CAG CCA CTG GCT CAT GCC CTG 3168
Gln Arg Val Glu Phe Ala Thr Leu Gln Gln Ala Leu Ala His Ala Leu
1045 1050 1055

ACC CAA AAG GAA GCG AAG CAG CAG GAG TTG GCG AAG CTT CTT GCT CTG 3216
Thr Glu Lys Glu Gly Lys Asp Gln Glu Leu Ala Lys Leu Arg Gly Leu
1060 1065 1070

CAG CCA GCG CAG ATA AAA GAG CTG CAG GAA CTT CCG CAA ACC GTC AAG 3264
Glu Ala Ala Gln Ile Lys Glu Leu Glu Glu Leu Arg Gln Thr Val Lys
1075 1080 1085

CAA CTG AAG GAA CAG CTG GCT AAG AAA GAA AAG GAG CAC GCA TCT GGC Gln Leu Lys Glu Gln Leu Ala Lys Lys Glu Lys Glu His Ala Ser Gly 1090 1095 1100	3312	TCC GGG AGG GAG GCT GAG AAA CAG GGG GTG GCT TCA GAG AAC CTG GGG Ser Gly Arg Glu Ala Glu Lys Gln Arg Val Ala Ser Glu Asn Leu Arg 1300 1305 1310	3936
TCA GCA GGC CAA TCT GAG GCT GCT GGC AGG ACA GAG CCA ACA GGC GGC Ser Gly Ala Gln Ser Glu Ala Ala Gly Arg Thr Glu Pro Thr Gly Pro 1105 1110 1115	3360	CAG GAG CTG ACC TCA CAG GCT GAG GCT GCG GAG CAG CTG GGC CAA GAA Gln Glu Leu Thr Ser Glu Ala Glu Arg Ala Gln Glu Leu Gly Gln Glu 1315 1320 1325	3984
AAG CTG GAA GCA CTG GGG GCA GAG CTG AGC AAG CTG GAA CAG CAA TGC Lys Leu Glu Ala Leu Arg Ala Glu Val Ser Lys Leu Glu Gln Gln Cys 1125 1130 1135	3408	TTG AAG GCG TGG CAG GAG AAG TTC TTC CAG AAA GAG GGC CTC TGC Leu Lys Ala Trp Gln Glu Lys Phe Phe Gln Lys Gln Glu Ala Leu Ser 1330 1335 1340	4032
CAG AAG CAG CAG CAG GCT CAC AGC CTG GAA GGC AGC CTC GAG GCT Gln Lys Gln Gln Glu Ala Asp Ser Leu Glu Arg Ser Leu Glu Ala 1140 1145 1150	3456	ACC CTG CAG CTC GAG CAC ACC AGC ACA CAG GGC CTG CTC AGT GAG CTG Thr Leu Gln Leu Glu His Thr Ser Thr Gln Ala Val Ser Glu Leu 1345 1350 1355	4080
CAG GCG GGC TCC GCG GCT CAG GCG GAG AGT GCT CTG GAG ACT CTG CAG Glu Arg Ala Ser Arg Ala Glu Arg Asp Ser Ala Leu Glu Thr Leu Gln 1155 1160 1165	3504	CTG CCA GCT AAG CAC CTC TGC CAG CAG CTG CAG GGC GAG CAG GGC GCT Leu Pro Ala Lys His Leu Cys Gln Gln Leu Glu Ala Glu Gln Ala Ala 1365 1370 1375	4128
GGC CAG TTA GAG GAG AAG GGC CAG GAG CTA GGG CAC AGT CAG AGT GGC Gly Gln Leu Glu Glu Lys Ala Gln Glu Leu Gly His Ser Gln Ser Ala 1170 1175 1180	3552	GGC GAG AAA GGC CAC GCT GAG GAG CTG GAG CAG AGC AAG CAG GGC GCT Ala Glu Lys Arg His Arg Glu Glu Leu Glu Gln Ser Lys Gln Ala Ala 1380 1385 1390	4176
TTA GGC TGG GGC CAA GCG GAG TTG GCT GGC TTC GGC ACC AAG GTA CAA Leu Ala Ser Ala Gln Arg Glu Leu Ala Ala Phe Arg Thr Lys Val Gln 1185 1190 1195	3600	GGC GGA CTG GCG GCA GAG CTG CTG GCG GGC CAG GCG CAG CTT GCG GAG Gly Gly Leu Arg Ala Glu Leu Leu Arg Ala Gln Arg Glu Leu Gly Glu 1395 1400 1405	4224
GAC CAC AGC AAG GCT GAA GAT GAG TGG AAG GGC CAG GTG GCG GCG GGC Asp His Ser Lys Ala Glu Asp Glu Trp Lys Ala Gln Val Ala Arg Gly 1205 1210 1215	3648	CTG ATT CTT CTG GCG CAG AAG CTG GCA CAG CAG CAG CCA ACA GCT CAG Leu Ile Pro Leu Arg Gln Lys Val Ala Glu Gln Glu Arg Thr Ala Gln 1410 1415 1420	4272
GCG CAA GAG GCT CAG AGC AAA AAT AGC CTC ATC AGC AGC TTG GAG GAG Arg Gln Glu Ala Glu Arg Lys Asn Ser Leu Ile Ser Ser Leu Glu Glu 1220 1225 1230	3696	CAG CTG GCG GCA GAG AAG GGC AGC TAT GCA CAG CAG CTG AGC ATG CTG Gln Leu Arg Ala Glu Lys Ala Ser Tyr Ala Glu Gln Leu Ser Met Leu 1425 1430 1435	4320
CAG GTG TCC ATC CTG AAT GGC CAG GTG CTG GAG AAG GAG GCG GAG AGC Glu Val Ser Ile Leu Asn Arg Gln Val Leu Glu Lys Glu Gly Glu Ser 1235 1240 1245	3744	AAG AAG GCG CAT GGC CTG CTG GCA CAG CAG AAC GCG GCG CTG GCT GAG Lys Lys Ala His Gly Leu Leu Ala Glu Glu Asn Arg Gly Leu Gly Gln 1445 1450 1455	4368
AAG GAG TTG AAG GCG CTG GTG ATC GGC GAG TCA GAG AAG AGC CAG AAG Lys Glu Leu Lys Arg Leu Val Met Ala Glu Ser Glu Lys Ser Gln Lys 1255 1260 1265	3792	GCG GGC AAC CTT GGC GCG CAG TTT CTG GAA CTG CAG TTG GAG CAG GGC Arg Ala Asn Leu Gly Arg Gln Phe Leu Glu Val Glu Leu Asp Gln Ala 1460 1465 1470	4416
CTG GAG CAG AGC TGC GCG TGC TGC AGC CAG AGA CAG CCA GCA ATA GTG Leu Glu Glu Ser Cys Ala Cys Cys Arg Gln Arg Gln Pro Ala Thr Val 1270 1275 1280	3840	GCG GAA AAG TAT GTC CAA GAG TTG GCA GGC GTA CTT GCT GAT GCT CAG Arg Glu Lys Tyr Val Gln Glu Leu Ala Ala Val Arg Ala Asp Ala Glu 1475 1480 1485	4464
TCA GAG CTG CAG AAC GCA GCT CTG CTC TGC GGC AGG AGC TGC AGA GGC Pro Glu Leu Gln Asn Ala Ala Leu Leu Cys Gly Arg Arg Cys Arg Ala 1285 1290 1295	3888	ACC GGT CTG GCT GAG GTG CAG CCA GAA GCA CAG AGC ACT GGC GCG GAG Thr Arg Leu Ala Glu Val Gln Arg Glu Ala Gln Ser Thr Ala Arg Glu 1490 1495 1500	4512
CTG GAG GTG ATG ACT GGC AAG TAT CAG GGT GGC AAG GTC AAG GTG CTG Leu Glu Val Met Thr Ala Lys Tyr Glu Gly Ala Lys Val Lys Val Leu 1505 1510 1515	4560	CTG AGC TGC GAG GAG GGC ACC CCA CTC AGT ATC ACC AGC AAG CTG CTT Leu Ser Cys Glu Glu Gly Thr Pro Leu Ser Ile Thr Ser Lys Leu Pro 1715 1720 1725	5184
GAG GAG AGG CAG GCG TTC CAG GAA CAG AGG CAG AAA CTC ACT GGC CAG Glu Glu Arg Gln Arg Phe Gln Glu Glu Lys Leu Thr Ala Gln 1525 1530 1535	4608	CCT ACC CAG CCA GAG GGC ACC AGC GTC CTT GCA GAA CCA GGC TCA CTT Gly Thr Gln Pro Asp Gly Thr Ser Val Pro Gly Glu Pro Ala Ser Pro 1730 1735 1740	5232
GTG GAA GAA CTG AGT AAG AAA CTG GCT CAG TCT GAG CAA GGC AGC AAG Val Glu Glu Leu Ser Lys Lys Leu Ala Asp Ser Asp Gln Ala Ser Lys 1540 1545 1550	4656	ATC TCC CAG GCG CTG CCC CCC AAG GTA GAA TCC CTG CAG AGT CTC TAC Ile Ser Gln Arg Leu Pro Pro Lys Val Glu Ser Lys Glu Ser Leu Tyr 1745 1750 1755	5280
GTG CAG CAG CAG AAG CTG AAG GCT GTC CAG GCT CAG GCA GGC CAG AGC Val Gln Gln Lys Leu Lys Ala Val Gln Ala Gln Gly Gly Glu Ser 1555 1560 1565	4704	TTC ACT CCC ATC CTT CCG AGT CAG GGC CCC CTC CAG AGC AGC CTG Phe Thr Pro Ile Pro Ala Arg Ser Gln Ala Pro Leu Glu Ser Ser Thr 1765 1770 1775	5328
CAG CAG CAG GGC CAG GCG TTC CAG GGC CAG CTG AAT GAA CTG CAA GGC Gln Gln Glu Ala Gln Arg Phe Gln Ala Gln Leu Asn Glu Leu Gln Ala 1570 1575 1580	4752	GAC TCC CTG GCA GAG GTC TTC CTG CAG TCC GGT CTT AAG ACC GGC TCC Asp Ser Leu Gly Asp Val Phe Leu Asp Ser Gly Arg Lys Thr Arg Ser 1780 1785 1790	5376
CAG TTG AGC CAG AAG GAG CAG GCA GCT GAG CAC TAT AAG CTG CAG ATG Gln Leu Ser Gln Lys Glu Gln Ala Ala Glu His Tyr Lys Leu Gln Met 1585 1590 1595	4800	GCT CTT GCG GCG ACC AGC CAG ATC ATC AAC ATC ACC ATG ACC AAG AAG Ala Arg Arg Arg Thr Thr Gln Ile Ile Asn Ile Thr Met Thr Lys Lys 1795 1800 1805	5424
GAG AAA GGC AAA ACA CAT TAT GAT GGC AAG AAG CAG CAG AAC CAA GAG Glu Lys Ala Lys Thr His Tyr Asp Ala Lys Lys Gln Gln Asn Gln Glu 1605 1610 1615	4848	CTA GAT GTG GAA GAG CCA GAG AGC GGC AAC TCA TCG TTC TAC AGC AGC Leu Asp Val Glu Glu Pro Asp Ser Ala Asn Ser Ser Phe Tyr Ser Thr 1810 1815 1820	5472
CTG CAG GAG CAG CTG GCG AGC CTG CAG CAG CTG CAG AAG GAA AAC AAA Leu Gln Glu Gln Leu Arg Ser Leu Glu Gln Leu Gln Lys Glu Asn Lys 1620 1625 1630	4896	GCG TCT GCT CTT GCT TCC CAG GCT AGC CTG CCA GGC ACC TCC TCT ACT Arg Ser Ala Pro Ala Ser Gln Ala Ser Leu Arg Ala Thr Ser Ser Thr 1825 1830 1835	5520
GAG CTG GCA GCT GAA GCT GAA GCG CTG GGC CAT GAG TTA CAG CAG GCT Glu Leu Arg Ala Glu Ala Glu Arg Leu Gly His Glu Leu Gln Gln Ala 1635 1640 1645	4944	CAG TCT CTA GCT GCG CTG GGT TCT CCC GAT TAT GGC AAC TCA GGC CTG Gln Ser Leu Ala Arg Leu Gly Ser Pro Asp Tyr Gly Asn Ser Ala Leu 1845 1850 1855	5568
GCG CTG AAG ACC AAG CAG GCT CAA CAG AGC TGC GCG CAG CTT ACT GGC Gly Leu Lys Thr Lys Glu Ala Glu Gln Thr Cys Arg His Leu Thr Ala 1650 1655 1660	4992	CTC AGC TTG CTT GGC TAC GCG CCC ACC ACT GCG AGT TCT CTT CTT CTT Leu Ser Leu Pro Gly Tyr Arg Pro Thr Thr Arg Ser Ser Ala Arg Arg 1860 1865 1870	5616
CAG GTG GCG AGC CTG GAG GCA CAG GTT GGC CAT GCA CAG CAG CAG CTT Gln Val Arg Ser Leu Glu Ala Gln Val Ala His Ala Asp Gln Gln Leu 1665 1670 1675	5040	TCC CAG GCG GCG GTG TCC ACT GCG GCG CTT CCA GGA AGC AAC AGC TTC Ser Gln Ala Gly Val Ser Ser Gly Ala Pro Pro Gly Arg Asn Ser Phe 1875 1880 1885	5664
GCA GAG CTG GCG AAA TTC CAG GTG GCA ACT GAT GCT TTA AAG AGC GCT Arg Asp Leu Gly Lys Phe Gln Val Ala Thr Asp Ala Leu Lys Ser Arg 1685 1690 1695	5088	TAC ATG GGC ACT TGC CAG GAT CAG CTT GAG CAG CTG GAT CAG TGC AAC Tyr Met Gly Thr Cys Gln Asp Glu Pro Glu Gln Leu Asp Asp Trp Asn 1890 1895 1900	5712
GAG GCG CAG GCT AAG GCG CAG CTG GAG TTG AGT ATT CAG AGC CTG GAT Glu Pro Gln Ala Lys Pro Gln Leu Asp Leu Ser Ile Asp Ser Leu Asp 1700 1705 1710	5136	GCG ATT GCA GAG CTG CAG CAG GCG AAT CCA GTG TGC CCC CCA CAT CTG Arg Ile Ala Glu Leu Gln Gln Arg Asn Arg Val Cys Pro Pro His Leu 1905 1910 1915	5760

AAG ACC TGC TAT CCC CTC GAG TCC AGC CTT TTC CTG AGC CTG CCC ACC
Lys Thr Cys Tyr Pro Leu Glu Ser Arg Pro Ser Leu Ser Leu Gly Thr
1925 1930 1935

ATC ACA GAT GAG GAG ATC AAA ACT GGA GAC CCC CAA GAG ACC CTG CCC
Ile Thr Asp Glu Glu Met Lys Thr Gly Asp Pro Gln Glu Thr Leu Arg
1940 1945 1950

CGA GCC AGC ATG CAG CCA ATC CAG ATA GCT GAG GGC ACT GGC ATC ACC
Arg Ala Ser Met Gln Pro Ile Gln Ile Ala Gln Gly Thr Gly Ile Thr
1955 1960 1965

ACC CGC CAG CAG CCC AAA CGG GTC TTC CTA GAG CCC CAC CAG GGC CTT
Thr Arg Gln Gln Arg Lys Arg Val Ser Leu Gln Pro His Gln Gly Pro
1970 1975 1980

CGA ACT CTT GAG TCT AAG AAG GCC ACC AGC TGT TTC CCA GGC CCC ATG
Gly Thr Pro Glu Ser Lys Lys Ala Thr Ser Cys Phe Pro Arg Pro Met
1985 1990 1995 2000

ACT CCC CGA GAG CCA CAT GAA CGC CCC AAA CAG ACC ACT ACT GAG GGC
Thr Pro Arg Asp Arg His Glu Gly Arg Lys Gln Ser Thr Thr Glu Ala
2005 2010 2015

CAG AAG AAA GCA GCT CCA GCT TCT ACT AAA CAG GCT GAC CGC GGC CAG
Gln Lys Lys Ala Ala Pro Ala Ser Thr Lys Gln Ala Asp Arg Arg Gln
2020 2025 2030

TGC ATC GCT TTC AGC ATC CTC AAC ACA CCC AAG AAG CTA GGC AAC AGC
Ser Met Ala Phe Ser Ile Leu Asn Thr Pro Lys Lys Leu Gly Asn Ser
2035 2040 2045

CTT CTG CGC CGC GGA GCC TCA AAG AAG GCC CTG TCC AAG GCT TTC CCC
Leu Leu Arg Arg Gly Ala Ser Lys Lys Ala Leu Ser Lys Ala Ser Pro
2050 2055 2060

AAC ACT CCC ACT CGA ACC CGC CTT TCT CGC CGC ATT GCT ACC ACC ACA
Asn Thr Arg Ser Gly Thr Arg Ser Pro Arg Ile Ala Thr Thr Thr
2065 2070 2075 2080

GCC AGT CCC CCG ACT CCT CCC CCG ATT GCT GCT ACC CTT CCA GGC AAG
Ala Ser Ala Ala Thr Ala Ala Ile Gly Ala Thr Pro Arg Ala Lys
2085 2090 2095

GCC AAG CCA AAG CAC TAA
Gly Lys Ala Lys His
2100

5808

5856

5904

5952

6000

6048

6096

6144

6192

6240

6288

6306

(2) 配列番号4の情報:

(i) 配列の性状:

(A) 長さ: 2101アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直線状

(ii) 分子の型: 蛋白

(xi) 配列の記載: 配列番号4

Met Thr Leu His Ala Thr Arg Gly Ala Ala Leu Leu Ser Trp Val Asn
1 5 10 15

Ser Leu His Val Ala Asp Pro Val Glu Ala Val Leu Gln Leu Gln Asp
20 25 30

Cys Ser Ile Phe Ile Lys Ile Ile Asp Arg Ile His Gly Thr Glu Gln
35 40 45

Gly Gln Gln Ile Leu Lys Gln Pro Val Ser Glu Arg Leu Asp Phe Val
50 55 60

Cys Ser Phe Leu Gln Lys Asn Arg Lys His Pro Ser Ser Pro Glu Cys
65 70 75 80

Leu Val Ser Ala Gln Lys Val Leu Glu Gly Ser Glu Leu Gln Leu Ala
85 90 95

Lys Met Thr Met Leu Leu Leu Tyr His Ser Thr Met Ser Ser Lys Ser
100 105 110

Pro Arg Asp Trp Glu Gln Phe Glu Tyr Lys Ile Gln Ala Glu Leu Ala
115 120 125

Val Ile Leu Lys Phe Val Leu Asp His Glu Asp Gly Leu Asn Leu Asn
130 135 140

Glu Asp Leu Glu Asn Phe Leu Gln Lys Ala Pro Val Pro Ser Thr Cys
145 150 155 160

Ser Ser Thr Phe Pro Glu Gln Leu Ser Pro Pro Ser His Gln Ala Lys
165 170 175

Arg Glu Ile Arg Phe Leu Glu Leu Gln Lys Val Ala Ser Ser Ser Ser
180 185 190

Gly Asn Asn Phe Leu Ser Gly Ser Pro Ala Ser Pro Met Gly Asp Ile
195 200 205

Leu Gln Thr Pro Gln Phe Gln Met Arg Arg Leu Lys Lys Gln Leu Ala
210 215 220

Asp Glu Arg Ser Asn Arg Asp Glu Leu Glu Leu Glu Ala Glu Asn
225 230 235 240

Arg Lys Leu Leu Thr Glu Lys Asp Ala Gln Ile Ala Met Met Gln Gln
245 250 255

Arg Ile Asp Arg Leu Ala Leu Leu Asn Glu Lys Gln Ala Ala Ser Pro
260 265 270

Leu Glu Pro Lys Glu Leu Glu Glu Leu Arg Asp Lys Asn Glu Ser Leu
275 280 285

Thr Met Arg Leu His Glu Thr Leu Lys Gln Cys Gln Asp Leu Lys Thr
290 295 300

Glu Lys Ser Gln Met Asp Arg Lys Ile Asn Gln Leu Ser Glu Glu Asn
305 310 315 320

Gly Asp Leu Ser Phe Lys Leu Arg Glu Phe Ala Ser His Leu Gln Gln
325 330 335

Leu Gln Asp Ala Leu Asn Glu Leu Thr Glu Glu His Ser Lys Ala Thr
340 345 350

Gln Glu Trp Leu Glu Lys Gln Ala Gln Leu Glu Lys Glu Leu Ser Ala
355 360 365

Ala Leu Gln Asp Lys Lys Cys Leu Glu Glu Lys Asn Glu Ile Leu Gln
370 375 380

Gly Lys Leu Ser Gln Leu Glu Glu His Leu Ser Gln Leu Gln Asp Asn
385 390 395 400

Pro Pro Gln Glu Lys Gly Glu Val Leu Glu Asp Val Leu Gln Leu Glu
405 410 415

Thr Leu Lys Gln Glu Ala Ala Thr Leu Ala Ala Asn Asn Thr Gln Leu
420 425 430

Gln Ala Arg Val Glu Met Leu Gln Thr Glu Arg Gly Gln Gln Glu Ala
435 440 445

Lys Leu Leu Ala Glu Arg Gly His Phe Glu Glu Glu Lys Gln Gln Leu
450 455 460

Ser Ser Leu Ile Thr Asp Leu Gln Ser Ser Ile Ser Asn Leu Ser Gln
465 470 475 480

Ala Lys Glu Glu Leu Glu Gln Ala Ser Gln Ala His Gly Ala Arg Leu
485 490 495

Thr Ala Gln Val Ala Ser Leu Thr Ser Glu Leu Thr Thr Leu Asn Ala
500 505 510

Thr Ile Gln Gln Gln Asp Gln Glu Leu Ala Gly Leu Lys Gln Gln Ala
515 520 525

Lys Gln Lys Gln Ala Gln Leu Ala Gln Thr Leu Gln Gln Gln Gln
530 535 540

Ala Ser Gln Gly Leu Arg His Gln Val Glu Gln Leu Ser Ser Ser Leu
545 550 555 560

Lys Gln Lys Glu Gln Gln Leu Lys Glu Val Ala Glu Lys Gln Glu Ala
565 570 575

Thr Arg Gln Asp His Ala Gln Gln Leu Ala Thr Ala Ala Glu Glu Arg
580 585 590

Glu Ala Ser Leu Arg Glu Arg Asp Ala Ala Leu Lys Gln Leu Glu Ala
595 600 605

Leu Glu Lys Glu Lys Ala Ala Lys Leu Glu Ile Leu Gln Gln Gln Leu
610 615 620

Gln Val Ala Asn Glu Ala Arg Asp Ser Ala Gln Thr Ser Val Thr Gln
625 630 635 640

Ala Gln Arg Glu Lys Ala Glu Leu Ser Arg Lys Val Glu Glu Leu Gln
645 650 655

Ala Cys Val Glu Thr Ala Arg Gln Glu Gln His Glu Ala Gln Ala Gln
660 665 670

Val Ala Glu Leu Glu Leu Gln Leu Arg Ser Glu Gln Gln Lys Ala Thr
675 680 685

Glu Lys Glu Arg Val Ala Gln Glu Lys Asp Gln Leu Glu Gln Leu
690 695 700

Gln Ala Leu Lys Glu Ser Leu Lys Val Thr Lys Gly Ser Leu Glu Glu
705 710 715 720

Glu Lys Arg Arg Ala Ala Asp Ala Leu Glu Glu Gln Gln Arg Cys Ile
725 730 735

Ser Glu Leu Lys Ala Glu Thr Arg Ser Leu Val Glu Gln His Lys Arg
740 745 750

Glu Arg Lys Glu Leu Glu Glu Glu Arg Ala Gly Arg Lys Gly Leu Glu
755 760 765

Ala Arg Leu Leu Gln Leu Gly Glu Ala His Gln Ala Glu Thr Glu Val
770 775 780
Leu Arg Arg Glu Leu Ala Glu Ala Ser Ala Ala Gln His Thr Ala Glu
785 790 800
Ser Glu Cys Glu Gln Leu Val Lys Glu Val Ala Ala Trp Arg Asp Gly
805 810 815
Tyr Glu Asp Ser Gln Gln Glu Glu Ala Tyr Gly Ala Met Phe Gln
820 825 830
Glu Gln Leu Ser Thr Leu Lys Gln Glu Cys Glu Lys Ala Arg Gln Glu
835 840 845
Leu Gln Glu Ala Lys Glu Lys Val Ala Gly Ile Glu Ser His Ser Glu
850 855 860
Leu Gln Ile Ser Arg Gln Gln Asn Lys Leu Ala Glu Leu His Ala Asn
865 870 875 880
Leu Ala Arg Ala Leu Gln Gln Val Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Gln
885 890 895
Lys Leu Ala Asp Asp Leu Ser Thr Leu Gln Glu Lys Met Ala Ala Thr
900 905 910
Ser Lys Glu Val Ala Arg Leu Glu Thr Leu Val Arg Lys Ala Gly Glu
915 920 925
Gln Gln Glu Thr Ala Ser Arg Glu Leu Val Lys Glu Pro Ala Arg Ala
930 935 940
Gly Asp Arg Gln Pro Glu Trp Leu Glu Glu Gln Gly Arg Gln Phe
945 950 955 960
Cys Ser Thr Gln Ala Ala Leu Gln Ala Met Glu Arg Glu Ala Glu Gln
965 970 975
Met Gly Asn Glu Leu Glu Arg Leu Arg Ala Ala Leu Met Glu Ser Gln
980 985 990
Gly Gln Gln Gln Glu Glu Arg Gly Gln Gln Glu Arg Glu Val Ala Arg
995 1000 1005
Leu Thr Gln Glu Arg Gly Arg Ala Gln Ala Asp Leu Ala Leu Glu Lys
1010 1015 1020
Ala Ala Arg Ala Glu Leu Glu Met Arg Leu Gln Asn Ala Leu Asn Glu
1025 1030 1035 1040

Gln Arg Val Glu Phe Ala Thr Leu Gln Glu Ala Leu Ala His Ala Leu
1045 1050 1055
Thr Glu Lys Glu Gly Lys Asp Gln Glu Leu Ala Lys Leu Arg Gly Leu
1060 1065 1070
Glu Ala Ala Gln Ile Lys Glu Leu Glu Glu Leu Arg Gln Thr Val Lys
1075 1080 1085
Gln Leu Lys Glu Gln Leu Ala Lys Lys Glu Lys Glu His Ala Ser Gly
1090 1095 1100
Ser Gly Ala Gln Ser Glu Ala Ala Gly Arg Thr Glu Pro Thr Gly Pro
1105 1110 1115 1120
Lys Leu Glu Ala Leu Arg Ala Glu Val Ser Lys Leu Glu Gln Cys
1125 1130 1135
Gln Lys Gln Gln Glu Gln Ala Asp Ser Leu Glu Arg Ser Leu Glu Ala
1140 1145 1150
Glu Arg Ala Ser Arg Ala Glu Arg Asp Ser Ala Leu Glu Thr Leu Gln
1155 1160 1165
Gly Gln Leu Glu Glu Lys Ala Gln Glu Leu Gly His Ser Gln Ser Ala
1170 1175 1180
Leu Ala Ser Ala Gln Arg Glu Leu Ala Ala Phe Arg Thr Lys Val Gln
1185 1190 1195 1200
Asp His Ser Lys Ala Glu Asp Glu Trp Lys Ala Gln Val Ala Arg Gly
1205 1210 1215
Arg Gln Glu Ala Glu Arg Lys Asn Ser Leu Ile Ser Ser Leu Glu Glu
1220 1225 1230
Glu Val Ser Ile Leu Asn Arg Gln Val Leu Glu Lys Glu Gly Gln Ser
1235 1240 1245
Lys Glu Leu Lys Arg Leu Val Met Ala Glu Ser Glu Lys Ser Gln Lys
1250 1255 1260
Leu Glu Glu Ser Cys Ala Cys Cys Arg Gln Arg Gln Pro Ala Thr Val
1265 1270 1275 1280
Pro Glu Leu Gln Asn Ala Ala Leu Lys Cys Gly Arg Arg Cys Arg Ala
1285 1290 1295
Ser Gly Arg Glu Ala Glu Lys Gln Arg Val Ala Ser Glu Asn Leu Arg
1300 1305 1310

Gln Glu Leu Thr Ser Gln Ala Glu Arg Ala Glu Glu Leu Gly Gln Glu
1315 1320 1325
Leu Lys Ala Trp Gln Glu Lys Phe Phe Gln Lys Glu Gln Ala Leu Ser
1330 1335 1340
Thr Leu Gln Leu Glu His Thr Ser Thr Gln Ala Leu Val Ser Glu Leu
1345 1350 1355 1360
Leu Pro Ala Lys His Leu Cys Gln Gln Leu Gln Ala Glu Gln Ala Ala
1365 1370 1375
Ala Glu Lys Arg His Arg Glu Glu Leu Glu Gln Ser Lys Gln Ala Ala
1380 1385 1390
Gly Gly Leu Arg Ala Glu Leu Leu Arg Ala Gln Arg Glu Leu Gly Glu
1395 1400 1405
Leu Ile Pro Leu Arg Gln Lys Val Ala Glu Gln Glu Arg Thr Ala Gln
1410 1415 1420
Gln Leu Arg Ala Glu Lys Ala Ser Tyr Ala Glu Gln Leu Ser Met Leu
1425 1430 1435 1440
Lys Lys Ala His Gly Leu Leu Ala Glu Glu Asn Arg Gly Leu Gly Glu
1445 1450 1455
Arg Ala Asn Leu Glu Arg Gln Phe Leu Glu Val Glu Leu Asp Gln Ala
1460 1465 1470
Arg Glu Lys Tyr Val Gln Glu Leu Ala Ala Val Arg Ala Asp Ala Glu
1475 1480 1485
Thr Arg Leu Ala Glu Val Gln Arg Glu Ala Gln Ser Thr Ala Arg Glu
1490 1495 1500
Leu Glu Val Met Thr Ala Lys Tyr Glu Gly Ala Lys Val Lys Val Leu
1505 1510 1515 1520
Gln Glu Arg Gln Arg Phe Gln Glu Glu Arg Gln Lys Leu Thr Ala Gln
1525 1530 1535
Val Glu Glu Leu Ser Lys Lys Leu Ala Asp Ser Asp Gln Ala Ser Lys
1540 1545 1550
Val Gln Gln Gln Lys Leu Lys Ala Val Gln Ala Gln Gly Gly Gln Ser
1555 1560 1565
Gln Gln Glu Ala Gln Arg Phe Gln Ala Gln Leu Asn Glu Leu Gln Ala
1570 1575 1580

Gln Leu Ser Gln Lys Glu Gln Ala Ala Glu His Tyr Lys Leu Gln Met
1585 1590 1595 1600
Glu Lys Ala Lys Thr His Tyr Asp Ala Lys Lys Gln Gln Asn Gln Glu
1605 1610 1615
Leu Gln Gln Gln Leu Arg Ser Leu Glu Gln Leu Glu Lys Glu Asn Lys
1620 1625 1630
Glu Leu Arg Ala Glu Ala Glu Arg Leu Gly His Glu Leu Gln Gln Ala
1635 1640 1645
Gly Leu Lys Thr Lys Glu Ala Glu Gln Thr Cys Arg His Leu Thr Ala
1650 1655 1660
Gln Val Arg Ser Leu Glu Ala Gln Val Ala His Ala Asp Gln Gln Leu
1665 1670 1675 1680
Arg Asp Leu Gly Lys Phe Gln Val Ala Thr Asp Ala Leu Lys Ser Arg
1685 1690 1695
Glu Pro Gln Ala Lys Pro Gln Leu Asp Leu Ser Ile Asp Ser Leu Asp
1700 1705 1710
Leu Ser Cys Glu Glu Gly Thr Pro Leu Ser Ile Thr Ser Lys Leu Pro
1715 1720 1725
Arg Thr Gln Pro Asp Gly Thr Ser Val Pro Gly Glu Pro Ala Ser Pro
1730 1735 1740
Ile Ser Gln Arg Leu Pro Pro Lys Val Glu Ser Leu Glu Ser Leu Tyr
1745 1750 1755 1760
Phe Thr Pro Ile Pro Ala Arg Ser Gln Ala Pro Leu Glu Ser Ser Leu
1765 1770 1775
Asp Ser Leu Gly Asp Val Phe Leu Asp Ser Gly Arg Lys Thr Arg Ser
1780 1785 1790
Ala Arg Arg Arg Thr Thr Gln Ile Ile Asn Ile Thr Met Thr Lys Lys
1795 1800 1805
Leu Asp Val Glu Glu Pro Asp Ser Ala Asn Ser Ser Phe Tyr Ser Thr
1810 1815 1820
Arg Ser Ala Pro Ala Ser Gln Ala Ser Leu Arg Ala Thr Ser Ser Thr
1825 1830 1835 1840
Gln Ser Leu Ala Arg Leu Gly Ser Pro Asp Tyr Gly Asn Ser Ala Leu
1845 1850 1855

Leu Ser Leu Pro Gly Tyr Arg Pro Thr Thr Arg Ser Ser Ala Arg Arg
1860 1865 1870

Ser Gln Ala Gly Val Ser Ser Gly Ala Pro Pro Gly Arg Asn Ser Phe
1875 1880 1885

Tyr Met Gly Thr Cys Gln Asp Glu Pro Gln Gln Leu Asp Asp Trp Asn
1890 1895 1900

Arg Ile Ala Glu Leu Gln Gln Arg Asn Arg Val Cys Pro Pro His Leu
1905 1910 1915 1920

Lys Thr Cys Tyr Pro Leu Glu Ser Arg Pro Ser Leu Ser Leu Gly Thr
1925 1930 1935

Ile Thr Asp Glu Glu Met Lys Thr Gly Asp Pro Gln Glu Thr Leu Arg
1940 1945 1950

Arg Ala Ser Met Gln Pro Ile Gln Ile Ala Glu Gly Thr Gly Ile Thr
1955 1960 1965

Thr Arg Gln Gln Arg Lys Arg Val Ser Leu Glu Pro His Gln Gly Pro
1970 1975 1980

Gly Thr Pro Glu Ser Lys Lys Ala Thr Ser Cys Phe Pro Arg Pro Met
1985 1990 1995 2000

Thr Pro Arg Asp Arg His Gln Gly Arg Lys Gln Ser Thr Thr Glu Ala
2005 2010 2015

Gln Lys Lys Ala Ala Pro Ala Ser Thr Lys Gln Ala Asp Arg Arg Gln
2020 2025 2030

Ser Met Ala Phe Ser Ile Leu Asn Thr Pro Lys Lys Leu Gly Asn Ser
2035 2040 2045

Leu Leu Arg Arg Gly Ala Ser Lys Lys Ala Leu Ser Lys Ala Ser Pro
2050 2055 2060

Asn Thr Arg Ser Gly Thr Arg Arg Ser Pro Arg Ile Ala Thr Thr Thr
2065 2070 2075 2080

Ala Ser Ala Ala Thr Ala Ala Ala Ile Gly Ala Thr Pro Arg Ala Lys
2085 2090 2095

Gly Lys Ala Lys His
2100

(2) 配列番号5の情報:

(i) 配列の性状:

- (A) 長さ: 353塩基対
(B) 型: 核酸
(C) 鎖の数: 一本鎖
(D) トポロジー: 直線状

(ii) 分子の型: DNA

(ix) 特徴:

- (A) 名称/キー: mRNA
(B) 部位: 1...353
(D) 他の情報: /注記="MT1 mRNA転写物の一部分に対するアンチセンス配列: 蛋白のN-末端コード配列および上流53ヌクレオチド"

(ix) 特徴:

- (A) 名称/キー: misc_特徴
(B) 部位: 相補鎖(298...300)
(D) 他の情報: /注記="相補鎖のMT1開始コドン配列"

(xi) 配列の記載: 配列番号5:

CTCAATTCA ACTTGCTCTT GTTTTCTCG TTGTCAAGG CGAGCTGCA CTCCTTCAGG 60
TGTGCTGTC CTATAGAAG ATGAGGATGC TTGTAAAGT CGAGCTGTC GTTTTCTCTT 120
ACTAATTCA GGGTCATCAG TTTTAAAGA TTCTCAGGC TCACTGACG GGGCTGGGAC 180
CGACAGGTA TCAGCTCTG CAGAAATAT TTGAGGCTT TTGTAGGTC GTTTTCTCTT 240
ACGTGAGTA TTTCTTTT GTTCTTCAG TTGTAGGCA GGGCTTTTAT ATTCTTTCAT 300
TACTTCTGAT ACACATAGA TTTTATGTC ACCGAGTGA ATGCAATTTT TTG 353

(2) 配列番号6の情報:

(i) 配列の性状:

- (A) 長さ: 348塩基対
(B) 型: 核酸
(C) 鎖の数: 一本鎖
(D) トポロジー: 直線状

(ii) 分子の型: DNA

(ix) 特徴:

- (A) 名称/キー: mRNA
(B) 部位: 1...348
(D) 他の情報: /注記="MT2転写物の一部分に対するアンチセンス配列: 蛋白コード領域のN-末端および上流48ヌクレオチド"

(ix) 特徴:

- (A) 名称/キー: misc_特徴
(B) 部位: 相補鎖(298...300)
(D) 他の情報: /注記="相補鎖のMT2開始コドン配列"

(xi) 配列の記載: 配列番号6:

CATGCTATC TTGCGAGTT CGAGCTGCA TCGCTTACG ACCTTCTGTC CAGATACAG 60
GGCTTCTGG GAAGAGGAT GTTTTCTAT TTCTGAGA AACTGCACA CAAAGTCCAG 120
TTCTTTCAG ACCGCTGCT TTGATTTG CTGTGCTCT TCACTGCAAT GCAATCTGTC 180
AATGATTTG ATTAAGATTC TCACTGCTG GAGTGCAGC ACAGCTGCA CAGGCTACG 240
CAGCTGAGA CTGTTACCC AAGAGAGAG TCGAGCCCC GGGTGGCTT GCACTGTAT 300
CTTGTGATC CGAGAGATC ACTCCAATG GCTGTAATC CGAGCTAC 348

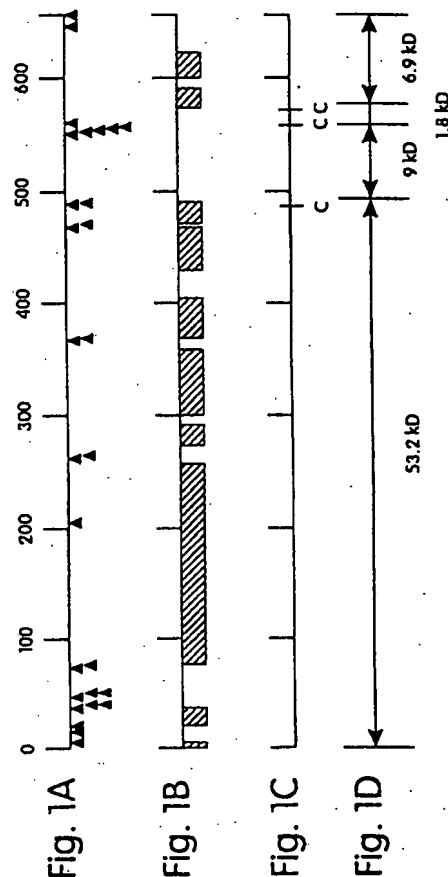


FIG. 3.1

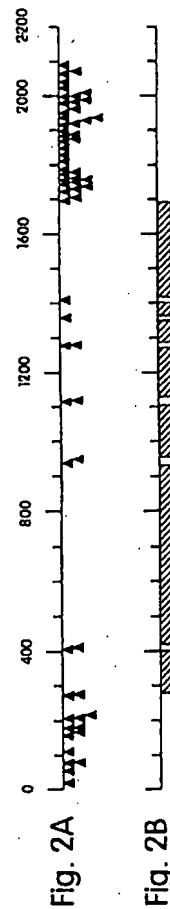


Fig. 2A

Fig. 2B

SAMPLE	SAMPLE #	ANTIBODY COMBINATIONS			
		302-22 302-18	302-33 107-7	302-29 302-18	302-29 107-7
NORMAL	1	0.0	0.0	0.0	0.0
NORMAL	2	0.0	0.0	0.0	0.0
NORMAL	3	0.0	0.0	0.0	0.0
NORMAL	4	0.0	0.0	0.0	0.0
NORMAL	5	0.0	0.0	0.0	0.0
NORMAL	6	0.0	0.0	0.0	0.0
NORMAL	7	0.0	0.0	0.0	0.0
NORMAL	8	0.0	0.0	0.0	0.0
NORMAL	9	0.0	0.0	0.5	0.0
NORMAL	10	0.0	0.7	1.2	0.0
NORMAL	11	0.0	0.0	0.0	0.0
NORMAL	12	0.0	0.0	0.0	0.2
NORMAL	13	0.0	0.7	0.0	0.3
NORMAL	14	0.0	1.3	0.0	0.6
NORMAL	15	0.0	5.3	0.0	1.7
NORMAL	16	0.0	1.4	0.0	0.4
NORMAL	17	0.0	2.2	0.0	1.0
NORMAL	18	0.0	2.0	0.0	0.0
NORMAL	19	0.0	3.0	0.0	0.4
NORMAL	20	0.0	2.3	0.0	1.3
NORMAL	21	0.0	3.9	0.0	0.6
NORMAL	22	0.0	8.2	0.0	1.3
NORMAL	23	0.0	4.0	0.0	0.8
NORMAL	24	0.0	4.3	0.0	0.7
NORMAL	25	0.0	9.1	0.0	0.6
NORMAL	26	0.0	5.9	0.0	0.2
NORMAL	27	0.0	20.6	0.0	6.0
NORMAL	28	0.9	2.2	0.9	0.7
NORMAL	29	1.4	5.0	0.0	1.0
NORMAL	30	1.4	3.5	1.4	1.2
NORMAL	31	1.9	10.1	3.9	1.0
NORMAL	32	2.1	3.3	0.0	6.3
NORMAL	33	2.8	1.5	0.0	0.0
NORMAL	34	4.1	6.9	6.6	0.8
NORMAL	35	4.2	0.0	5.4	0.0
NORMAL	36	11.0	1.2	5.6	0.0
BLADDER CA	37	0.0	0.0	0.0	0.0
BLADDER CA	38	36.7	1.6	0.0	0.0
BLADDER C	39	0.0	0.0	0.0	0.0
COLON CA	40	8.8	8.9	8.6	7.0
COLON CA	41	18.2	28.4	20.8	24.3
COLON CA	42	18.1	28.6	19.5	17.9
COLON CA	43	14.2	11.6	15.5	8.1
COLON CA	44	9.5	12.8	13.3	6.8
COLON CA	45	5.1	6.4	4.1	0.9
COLON CA	46	4.9	3.7	5.1	2.4

FIG. 3.2

SAMPLE	SAMPLE #	ANTIBODY COMBINATIONS			
		302-22 302-18	302-33 107-7	302-29 302-18	302-29 107-7
COLON CA	47	30.8	28.3	65.3	27.3
COLON CA	48	96.2	17.5	82.4	20.2
COLON CA	49	3.3	4.7	0.0	0.0
COLON CA	50	10.1	11.7	8.3	10.3
COLON CA	52	2.4	5.7	64.7	0.0
COLON CA	53	6.7	5.1	5.5	0.5
COLON CA	54	5.1	6.0	1.3	1.8
COLON CA	55	3.9	13.1	7.1	2.3
COLON CA	56	62.4	9.6	52.4	5.8
COLORECT CA	57	14.0	58.2	15.2	41.3
ENDOMETRIUM C	58	7.6	10.3	106.0	6.8
ENDOMETRIUM C	59	2.7	4.7	1.8	1.9
ENDOMETRIUM C	60	7.9	9.4	8.2	7.1
LUNG CA	61	10.0	13.4	10.7	9.3
LUNG CA	62	9.5	11.9	11.0	7.9
LUNG CA	63	11.3	19.0	13.5	16.2
LUNG CA	64	6.5	16.7	8.5	7.8
LUNG CA	65	12.6	20.8	14.9	11.0
OVARY CA	66	14.3	21.1	17.4	16.9
OVARY CA	67	7.0	16.4	9.9	8.9
OVARY CA	68	8.9	11.6	11.5	8.3
PROSTATE CA	69	11.4	12.7	13.8	10.8
PROSTATE CA	70	2.0	4.9	2.5	2.8
PROSTATE CA	71	6.4	0.0	9.3	3.4
PROSTATE CA	72	5.4	15.4	6.3	7.0
PROSTATE CA	73	2.2	0.0	1.6	0.0

FIG. 4

TISSUE TYPE	ASSAY 1*	ASSAY 2**	ASSAY 3***
Breast normal 90-247	NT	500	1250
Breast normal 90-252	7574	2705	5024
Breast normal 90-254	NT	1513	2789
Breast normal 90-264	NT	0	1685
Breast normal 90-268	139	NT	422
Breast cancer 90-256	438	NT	2750
Breast cancer 90-275	2000	NT	9429
Breast cancer 90-287	20222	7333	8600
Cervix normal 90-279	2500	NT	12571
Cervical cancer 90-8083	12666	NT	70680
Colon normal 90-253	1009	NT	1689
Colon cancer 90-250	1450	NT	4275
Kidney normal 90-259	4250	NT	4275
Kidney cancer 90-289	2407	NT	5796
Liver normal	2154	614	202
Liver normal 90-451	NT	131	420
Liver cancer	2227	0	932
Met liver 90-403	NT	300	1133
Lung normal 90-248	4391	NT	6636
Lung normal 90-246	4200	NT	10000
Lung normal 90-107	NT	4166	388
Lung normal 90-118	NT	650	1200
Lung cancer 90-095	NT	5357	16077
Lung cancer 90-121	NT	>12000	40771
Ovarian cancer	8621	6517	2760
Ovarian cancer 90-260	6900	NT	20680
Ovarian cancer 90-291	2768	NT	5750
Ovarian cancer 90-291	NT	10909	14454
Uterine cancer 90-277	6574	NT	70584
Uterus normal 90-295	6574	NT	41444
average normal	3447	1284	5759
average cancer	9442	7069	26321

* Assay 1 is 107.7 solid phase and 307.33 soluble phase.
 ** Assay 2 is 107.7 solid phase and 302.29 soluble phase.
 *** Assay 3 is 302.18 solid phase and 302.22 soluble phase.
 # NT means not tested.

平成6年12月21日

特許庁長官 高 島 章 殿

1. 特許出願の表示 PCT/US93/06160

2. 発明の名称 新規な悪性細胞型内部核マトリックスマーカー

3. 特許出願人

住 所 アメリカ合衆国 02138 マサチューセッツ、ケンブリッジ、
コンコード アベニュー 763 ディ

名 称 マトリテク インコーポレイテッド

国 籍 アメリカ合衆国

4. 代 理 人

住 所 東京都新宿区四谷1丁目2番1号
三浜ビル8階

郵便番号 160 電話 3226-6671

氏 名 (9094) 弁理士 藤 野 清 也

住 所 同 所

氏 名 (10506) 弁理士 児 玉 喜 博

5. 補正書の提出年月日 1994年6月2日

6. 添付書類の目録

(1) 補正書の写し(翻訳文)

1通



物を形成し:

b) 該組成物を哺乳類に注射し、組換え体により製造した当該蛋白または蛋白フラグメントに対して当該哺乳類に抗体産生を誘発し;

c) 当該哺乳類から当該抗体を分離するという、a) - c) の工程を含む、異常な細胞型の検出に使用する抗体の製造方法。

10. 当該抗体を当該哺乳類から分離する当該工程が、当該抗体を産生する細胞を当該哺乳類から分離することによって実施される請求の範囲第9項の方法。

11. (a) 配列番号1もしくは3またはその変種のDNAによってコードされるアミノ酸配列を含むマーカー蛋白上のエピトープを認識する結合蛋白とサンプルを接触させ;

1. 配列番号1の、その変種を含む配列を含むDNA分離核酸。

2. 適切なハイブリダイゼーション条件下、例えば50%ホルムアミド、5xSSPE、2xデンハルト溶液、0.1% SDS、40℃で、配列番号1のDNA配列とハイブリダイズする分離核酸。

3. 請求の範囲第1項または第2項の核酸をトランスフェクトした宿主細胞。

4. 請求の範囲第1項または第2項の核酸を含むベクター。

5. 配列番号1の、その変種を含むDNA配列によってコードされる、アジュバントと組み合わされた蛋白または蛋白フラグメント。

6. 配列番号1の、その変種を含むDNA配列によってコードされる分離蛋白。

7. 請求の範囲第6項の蛋白上のエピトープと結合する結合蛋白。

8. 当該結合蛋白が抗体または抗体フラグメントである、請求の範囲第7項の結合蛋白。

9. a) その変種を含む配列番号1のDNAによってコードされる、組換え体によって製造した蛋白または蛋白フラグメントをアジュバントと組み合わせて、哺乳類の注射に適した組成

d) 当該検出濃度を比較するという付加的工程を含む請求の範囲第20項の方法であって、ここで、当該検出濃度における変化が当該組織の状態の指標となる請求の範囲第20項の方法。

22. 当該検出濃度の減少が細胞死の減少の指標となり、当該検出濃度の増加が細胞死の増加の指標となる、病状の変化または治療効果をモニターするために使用する請求の範囲第20項の方法。

23. 当該組織が乳房、前立腺、肺、結腸、卵巣、膀胱または子宮頸部組織の特徴を示す請求の範囲第20項の方法。

24. a) 翻訳されたときに、その転写物が配列番号1もしくは配列番号3またはその変種のアミノ酸配列をコードする、配列番号1または3のDNA配列によってコードされるmRNA転写物と相補的なスクレオチド配列を含む核酸とサンプルを接触させ;さらに、

b) 該サンプルにおいて当該mRNA転写物もしくはフラグメントまたはその変種の存在を検出するという、a)およびb)の工程を含む細胞または細胞核残屑を含むサンプルにおける異常細胞型の検出方法。

25. 当該異常細胞型が悪性細胞型である請求の範囲第24項の方法。

26. 当該悪性細胞型が、乳房、前立腺、肺、結腸、子宮頸部または膀胱の悪性細胞型の特徴を示す請求の範囲第25項の方法。

国際調査報告

US 9306160
SA 76663

This report lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are so classified in the European Patent Office (EPO) file as follows:
The European Patent Office is in no way liable for those particulars which are merely given for the purpose of information. 06/10/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-8703910	02-07-87	US-A- 4882268 EP-A- 0250589 JP-T- 63502484 US-A- 4885236	21-11-89 07-01-88 22-09-88 05-12-89
WO-A-9309437	13-05-93	AU-A- 3123593	07-06-93

For more details about this report, see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/93

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

識別記号

庁内整理番号

F I

A 6 1 K 39/00

H 9284-4C

48/00

8314-4C

C 0 7 H 21/04

B 8615-4C

C 0 7 K 14/435

8318-4H

16/18

C 1 2 P 21/02

C 9282-4B

C 1 2 Q 1/68

A 9453-4B

G 0 1 N 33/574

A 7055-2J

// (C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:19)